



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

TAXA DE EMULSIFICAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUE

Natascha Krepsky; Fernanda Queiróz; Mabel Araújo de Barcelos; Luis Francisco Fontana; José Augusto Pires Bittencourt; Alessandro L. Pimenta, Frederico Sobrinho da Silva, Maria das Graças Silveira Bispo; Mírian Araújo Carlos Crapez¹.

Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha. Cx.

P.100.644. Niterói, RJ. CEP: 24001-970. E-mail: mirian@vm.uff.br¹

Resumo – O derramamento de óleo ou gasolina durante o transporte marítimo ou em postos de distribuição pode causar danos ao ambiente devido a sua afinidade pela matéria orgânica e sua distribuição na lâmina d'água de lençóis freáticos e oceanos, limitando a biorremediação. A utilização de surfactantes de origem bacteriana potencializa a remoção de hidrocarbonetos de petróleo desses ambientes. Sendo assim, o estudo da emulsificação é um passo fundamental para a aplicação futura desta tecnologia em programas de despoluição ambiental. Para determinar as taxas de emulsificação em presença de três derivados do petróleo, gasolina, querosene e Árabe leve, isolamos consórcios bacterianos a partir de amostras de sedimento superficial de mangue previamente impactado com hidrocarbonetos da APA de Guapimirim, RJ. Os consórcios estudados mostraram alta taxa de emulsificação, em especial da gasolina, que se mostrou relacionada com a biomassa. Nossos resultados indicam que o biosurfactante produzido poderá ser útil na remediação de ambientes impactados com gasolina ou Árabe leve.

Palavras-Chave: *Bacillus sp.*; biosurfactante, taxas de emulsificação; biorremediação, mangue, Baía de Guanabara

Abstract – Oil spillage during ship transportation or at gas stations may be deleterious to environment due to its affinity for organic matter and its prompt distribution over the ground water surface, limiting bioremediation. The usage of bacterial surfactants can enhance the removal of petroleum hydrocarbons from the impacted area. Thus, the study of bacterial emulsification is relevant for improved environmental decontamination programs. Three *Bacillus spp.* were isolated from mangrove sediment of APA de Guapimirim -RJ, a protection area previously impacted with petroleum hydrocarbon. Emulsification index was quantified from gasoline, kerosene and Arabian light. The bacteria showed a high emulsification index, especially for gasoline, that seemed to be related to its biomass. Our results indicated a possible utilization of this biosurfactant in the environmental remediation on areas impacted with gasoline or Arabian light.

Keywords: *Bacillus sp.*; biosurfactant, emulsification index, bioremediation, mangrove, Baía de Guanabara

1. Introdução

A contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tem causado danos críticos ao ambiente e à saúde, uma vez que estas substâncias são solúveis em substâncias lipídicas, tendendo a se concentrar no fígado de animais marinhos (Libes, 1992). Como consequência, os HPAs se ligam irreversivelmente aos componentes da matéria orgânica, tornando-se indisponíveis para os microrganismos removerem e/ou degradá-los. Devido a este fato, uma maior atenção tem sido voltada ao desenvolvimento e implementação de técnicas inovadoras para descontaminação ambiental. Métodos de biorremediação têm recebido publicidade favorável como tecnologia promissora no tratamento de impactos de hidrocarbonetos no meio ambiente (van Loosdrecht et al, 1990, Rahman et al, 2002).

Pela evolução, as bactérias foram se adaptando do ponto de vista nutricional, sendo capazes de utilizarem variadas fontes de carbono, inclusive substâncias imiscíveis em água. Para isto, produzem biosurfactantes, que as ajudam a absorver, emulsificar, hidratar e dispersar ou solubilizar materiais hidrofóbicos. Os surfactantes podem ser produzidos como metabólitos secundários por leveduras, fungos e/ou bactérias, a partir de substratos, que incluem açúcares, óleos e ácidos graxos em geral. Eles são efetivos na redução da viscosidade e tensão interfacial da camada de óleo na água *in situ*, bem como no processo de desidratação da emulsão anterior ao processamento e liberação de betume. Comparados aos surfactantes não biogênicos, os biosurfactantes têm maior tolerância à variação de pH, temperatura e salinidade, são mais seletivos, menos tóxicos, biodegradáveis, existindo ainda a possibilidade de serem produzidos *in situ* pelos microrganismos, que se utilizariam dos contaminantes orgânicos como substrato para crescimento (Mulligan et al, 2001; Rahman et al, 2002). Do ponto de vista do desenvolvimento sustentável, é importante que as substâncias liberadas no ambiente sejam biodegradáveis, a fim de limitar potenciais danos e acúmulo de substâncias recalcitrantes, bem como preservando e protegendo a riqueza e diversidade de espécies (Healy et al, 1996).

Os surfactantes têm sido utilizados como adesivos industriais; agentes de floculação, de solubilização e espumantes; de-emulsificadores e penetrantes. O vazamento de óleos ou gasolina em postos de distribuição, podendo atingir o lençol freático, gera problemas como a distribuição do substrato hidrofóbico na lâmina d'água e adsorção deste à matéria orgânica. Os tratamentos de biorremediação, como a bioamplificação e bioestimulação, não solucionam prontamente esses vazamentos. O uso de biosurfactantes, capazes de emulsificarem as fases aquosa e não aquosa, potencializa a remoção de hidrocarbonetos de petróleo da camada superficial de coluna d'água, bem como os adsorvidos a solo ou sedimento marinho. Além disto, os biosurfactantes funcionam como agentes quelantes de metais.

Visando intensificar a busca de soluções para a recuperação ambiental, restabelecendo a sua sustentabilidade, foram iniciados estudos de produção de biosurfactantes por cepas de *Bacillus spp.*, isoladas de sedimento de mangue da APA de Guapimirim, Baía de Guanabara. O objetivo é determinar as taxas de emulsificação em presença de três derivados do petróleo, gasolina, querosene e Árabe Leve, em dois períodos de crescimento bacteriano.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta, isolamento e manutenção de bactérias hidrocarbonoclasticas

Foram coletadas amostras de sedimento superficial de mangue da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guapimirim, município de São Gonçalo, RJ, previamente impactado com hidrocarbonetos. O sedimento recebeu choque térmico a 80°C, 20 minutos, para isolamento de consórcios de *Bacillus spp* e foi incubado em meio de cultura seletivo para bactérias hidrocarbonoclasticas. Após isolamento, as bactérias foram mantidas neste meio de cultura, em temperatura de 37°C.

2.2. Produção de biosurfactante

Os consórcios bacterianos foram inoculados em tubos de vidro com tampa rosqueada, durante 98 horas. A verificação da produção de biofilme foi constatada através da presença de crescimento bacteriano nas paredes internas do tubo e através do colapso da gota da suspensão em superfície recoberta com óleo. Foram selecionadas aquelas que apresentaram resultado positivo e maior biomassa.

2.3. Separação das cepas de *Bacillus spp.* dos consórcios

Para selecionar dos consórcios as cepas de melhor eficiência na produção de surfactantes, foram realizados plaqueamentos em meio sólido com 0,8% de vermelho Congo.

2.4. Determinação de biomassa bacteriana

As bactérias que apresentaram resultados positivos no item anterior, foram inoculadas em meio de cultura e incubadas por 15 dias a 37°C. A verificação da taxa de emulsificação (E_{24} %) dessas bactérias em querosene, gasolina e árabe leve foi realizada em triplicata com acompanhamento de 7 e 15 dias de incubação. Uma alíquota foi retirada para contagem da biomassa bacteriana nos dias 0, 7 e 15, antes da adição dos derivados do petróleo. As células foram coradas com laranja de acridina, contadas em microscopia de epifluorescência como descrito por Kepner et al. (1994) e a biomassa bacteriana foi calculada através do método de Carlucci et al (1986). Após a contagem, cada composto foi

adicionado no meio de cultura na proporção de 3:2 v/v e a taxa de emulsificação foi estimada segundo Paraszkiwicz et al (2002).

3. Resultados e Discussão

A região da APA de Guapimirim, e outras áreas da Baía de Guanabara sofreram impacto por petróleo em janeiro de 2000, equivalente a 300.000 galões de óleo, com densidades diferentes (Michel, 2000). Após este impacto, foram coletadas amostras de sedimento de mangue e isolados três consórcios bacterianos, pertencentes ao gênero *Bacillus spp.*

O plaqueamento em meio sólido permitiu separar dos consórcios, 3 cepas bacterianas com maior biomassa, produzindo colônias mucóides, que apresentavam coloração rosa-avermelhada pelo vermelho Congo. Como discriminadas abaixo, as bactérias foram separadas em dois grupos, com fontes de carbono diferentes. O grupo AL, foi mantido em meio de cultura líquido, utilizando o Árabe Leve como fonte de carbono; o grupo S, passou a utilizar a sacarose (Tabela 1).

Tabela 1. Relação das bactérias isoladas de sedimento de mangue e utilizadas nos bioensaios.

Bactéria	Gênero	Local de isolamento	Fonte de carbono
AL1	<i>Bacillus spp.</i>	APA de Guapimirim	Árabe Leve
AL2	<i>Bacillus spp.</i>	APA de Guapimirim	Árabe Leve
AL3	<i>Bacillus spp.</i>	APA de Guapimirim	Árabe Leve
S4	<i>Bacillus spp.</i>	APA de Guapimirim	Sacarose
S5	<i>Bacillus spp.</i>	APA de Guapimirim	Sacarose
S6	<i>Bacillus spp.</i>	APA de Guapimirim	Sacarose

A emulsificação da gasolina foi verificada em todas as bactérias com 7 dias de incubação. A maior taxa (76,90%) ocorreu com AL3. Apenas quatro cepas de *Bacillus spp.* emulsificaram o querosene ou Árabe Leve, com taxas mais baixas que a anteriormente citada. Com 15 dias de incubação, as taxas de emulsificação da gasolina aumentaram 85,40 – 86,30 e 53,90% para AL1, AL3 e S4, respectivamente. O querosene e o Árabe Leve também foram emulsificados, com taxas variando entre 3,30 e 46,40% (Tabela 2).

Todas as bactérias apresentaram emulsificação da fase não aquosa (A) para a gasolina, independente do tempo de incubação. As maiores taxas ficaram entre 51,40 e 75,90%, para as cepas AL3, S4, S5 e S6, com 7 dias de incubação. Houve aumento desta taxa com 15 dias de incubação para 5 bactérias, exceto S6, cuja taxa de emulsificação na fase não aquosa caiu para 45,10%. Poucas cepas apresentaram esta taxa de emulsificação para o querosene e o Árabe Leve (Tabela 2).

Os percentuais de taxa de emulsificação na fase aquosa (B) para gasolina foram superiores aos obtidos anteriormente, variando entre 55,60 e 128,20%, para 5 cepas. De um modo geral, as maiores taxas foram obtidas com 15 dias de incubação ou puderam ser quantificadas somente neste período, seja para o querosene ou Árabe Leve (Tabela 2).

Tabela 2. Emulsificação da gasolina, querosene e Árabe Leve por bactérias isolados de sedimento de mangue com 7 e 15 dias de incubação.

Bactérias	Substâncias	E ₂₄ (%)		A (%)		B(%)	
		7	15	7	15	7	15
AL1	Gasolina	22,10	85,40	14,90	58,80	33,80	128,20
	Querosene	ND	26,80	ND	ND	ND	42,70
	Árabe Leve	38,40	33,30	40,00	ND	33,30	38,60
AL2	Gasolina	28,90	44,00	49,00	96,00	15,90	ND
	Querosene	44,30	46,40	74,20	56,70	ND	22,00
	Árabe Leve	ND	30,70	ND	ND	ND	34,60
AL3	Gasolina	76,90	86,30	71,40	94,10	106,40	103,70
	Querosene	ND	16,20	ND	26,40	ND	ND
	Árabe Leve	ND	36,40	ND	ND	ND	41,80
S4	Gasolina	36,90	53,90	51,40	53,70	ND	68,90
	Querosene	ND	3,30	ND	5,50	ND	ND
	Árabe Leve	ND	34,00	ND	ND	ND	38,80
S5	Gasolina	48,90	36,00	59,30	73,80	55,60	ND
	Querosene	10,30	32,30	16,50	33,30	ND	31,80
	Árabe Leve	0,00	33,40	ND	ND	ND	38,80
S6	Gasolina	43,90	29,20	75,90	45,10	27,77	16,00
	Querosene	ND	28,50	ND	28,90	ND	ND
	Árabe Leve	10,40	42,10	8,80	ND	8,00	46,40

E₂₄: taxa de emulsificação com 24 horas de repouso; A: emulsificação na fase não aquosa; B: emulsificação na fase aquosa; ND: não detectado

A biomassa bacteriana aumentou com o período de incubação, para as cepas que utilizaram Árabe Leve e sacarose, como fontes de carbono. As biomassas de AL3 e S4 foram subestimadas, pois a adição do meio aquoso contendo o cromóforo, provocou aglutinação das células em região densa de muco, possibilitando apenas a determinação parcial da biomassa. As maiores taxas de carbono bacteriano foram obtidas por AL1 com 4,699 $\mu\text{g C. cm}^{-3}$ (Figura 1). Neste caso, além de maior biomassa, também ficou responsável pela maior taxa de emulsificação em fase aquosa para a gasolina. A produção de biosurfactante esteve ligada ao aumento de carbono bacteriano, apresentando melhores taxas de emulsificação aos 15 dias de incubação, exceto para S6. Este processo está indicando que, para 5 cepas de *Bacillus spp.*, o contato com o composto hidrofóbico em proporção maior que o meio de cultura (3:2 v/v), foi capaz de induzir síntese de biosurfactante, capaz de emulsionar as fases aquosa e não aquosa. A capacidade de emulsionar esteve ligada ao aumento de biomassa, que não foi inibida pelas substâncias hidrofóbicas.

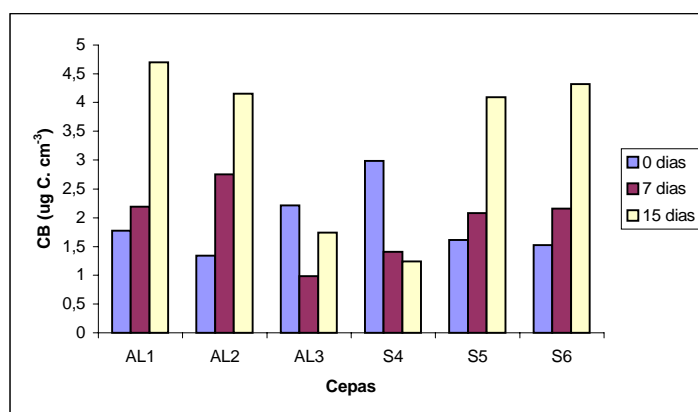


Figura 1. Carbono bacteriano ($\mu\text{g C. cm}^{-3}$) das cepas de *Bacillus spp.*, com 0, 7 e 15 dias de incubação.

Em estudos com a produção de biosurfactantes por bactérias Gram-positivas, utilizando óleo diesel como fonte de carbono, foi encontrada taxa máxima de emulsificação de 12,00% (Cassidy e Hudak, 2001). *Rhodococcus spp.*, isolados de sítios contaminados com óleo diesel e utilizando extrato de levedura, glicose e lactose como fontes de carbono, apresentaram emulsificação entre 10,00 e 60,00% (Bicca *et al.*, 1999). As altas taxas encontradas em *Bacillus spp.*, isolados de sedimento de mangue e mantidos em cultura com Árabe Leve, como fonte de carbono, estão indicando a capacidade de emulsionar petróleo e seus derivados.

A gasolina utilizada nos experimentos é a normalmente distribuída nos postos, tem densidade de 0,75 e contém 22,00% de álcool etílico, sendo que 76,70% de sua massa é composta de carbono (www.demec.ufmg.br, 2002). As cepas de *Bacillus spp.*, preferencialmente, emulsionaram a gasolina, tanto em meio aquoso quanto na fase oleosa. Neste caso, nos processos de descontaminação de lençol freático, o biosurfactante produzido poderia ser utilizado tanto na coluna d'água quanto no solo e/ou sedimento, possibilitando até a retirada do contaminante adsorvido à matéria orgânica. Nossos resultados apontam para uma possível aplicação do biosurfactante produzido para recuperação de ambientes impactados, notadamente por gasolina e, em seguida, por Árabe Leve.

4. Apoio financeiro



5. Referências

- 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 bioslurry reactor. *J. Hazardous Mat.* v. B84, p. 253-264, 2001.
- 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 fluorochromes for direct enumerations of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbio. Rev.* v. 58, p. 603-615, 1994.
- LIBES, S.M. The fate of pollutants in the coastal ocean. *An introduction to marine biogeochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1992.
- MICHEL, J. Assessment and recommendations for the oil spill cleanup of Guanabara Bay, Brazil. *Spill Sci. Technol. Bull.* v. 6, p. 89-96, 2000.
- MULLIGAN, C.N., YONG, R. N., GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.*, v. 60, p. 371-380, 2001.
- PARASZKIEWICZ, K., KANWAL, A., DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotech.*, v. 92, p. 287- 294, 2002.
- RAHMAN, K.S.M., BANAT, I.M., THAHIRA, J., THA. THAYAUMANAVAN, LAKSHMANAPERMAALSAMY, 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.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W., LEHNDER, A. J.B. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbio. Rev.*, v. 54, p. 75-87, 1990.