

## ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO DA BIOMASSA E SÍNTESE DE BIOSURFACTANTES POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE POÇOS DE PETRÓLEO

Ana Katerine de Carvalho lima Lobato<sup>1</sup>, Manuelle Meike Silva de Araújo<sup>2</sup>, Gorete Ribeiro de Macedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluna de Pós-Graduação PPGEQ/UFRN e Bolsista CTPetro. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN / Departamento de Engenharia Química - DEQ / Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ / Centro de Tecnologia – CT, Av.

Senador Salgado Filho – Campus Universitário, CEP 59.072-970 - Natal/RN – Brasil

<sup>2</sup>Aluna de Pós-Graduação PPGEQ/UFRN e Bolsista PRH-ANP 14, <sup>2</sup>manuelle@eq.ufrn.br

<sup>3</sup>Professora Doutora do Departamento de Engenharia Química

**Resumo** – Biosurfactantes são grupos estruturalmente diversificados de moléculas de superfície ativa, sintetizados por microrganismos como bactérias e fungos, cultivados em várias fontes de carbono tais como sacarose e hidrocarbonetos. Estas moléculas, compostas por uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, agem preferencialmente na interface entre as fases fluidas com diferentes polaridades vinculando interfaces óleo/água ou água/óleo reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre estas fases. Destacam-se em aplicações ambientais, podendo serem utilizados na bioremediação de solos e mananciais contaminados como também na limpeza de tanques e equipamentos. Reservatórios de óleo oferecem condições onde alguns microrganismos podem se desenvolver e estes, quando isolados e cultivados em laboratório, podem ser caracterizados quanto à produção de surfactantes. Neste trabalho, isolou-se microrganismos de poços de petróleo e selecionou-se, dentre os isolados, os produtores de biosurfactantes para formação de um banco de culturas com potencial aplicação no tratamento de acidentes ambientais e na recuperação avançada de óleo. Uma cepa deste banco foi cultivada em meio contendo hidrocarbonetos e sacarose, onde avaliaram-se a produção de biosurfactante pela medida da tensão superficial, a produção de biomassa do microrganismo por densidade óptica em espectrofotômetro e o consumo de substrato pelo método DNS.

Palavras-Chave: microrganismo; biosurfactante; petróleo; meio ambiente

**Abstract** – Biosurfactants are structurally diversified groups of active surface molecules synthesized by microorganisms as bacteria and fungi, cultivated in several carbon sources such as sucrose and hydrocarbons. These molecules, composed by a part hydrophilic and other hydrophobic one, they act preferentially in the interface among the flowing phases with different polarities linking interfaces oil/water or water/oil reducing the superficial tensions and interfacial among these phases. They have been used in environmental applications, such as bioremediation of soils, treatment of contaminated water fountains and in cleaning process of tanks and equipments. Oil reservoirs present conditions where some microorganisms can grow. These microorganisms when isolated and cultivated at laboratory can be characterized with relation to surfactants production. In this work, microorganisms were isolated of oil wells and the biosurfactants producers were selected, among the isolated ones, to form a culture bank with potential application in environmental pollution treatment and advanced oil recovery. A microorganism stump of the developed bank was cultivated in sucrose and hydrocarbon medium and the biosurfactant production was evaluated by superficial tension measurement. The microorganism biomass production was evaluated by optical density using a spectrophotometer and the substratum consumption by DNS method.

Keywords: microorganism, biosurfactant, petroleum, environment

## 1. Introdução

Biosurfactantes formam um grupo heterogêneo de moléculas de superfície ativa sintetizados por microrganismos podendo ser intracelular ou extracelular. Estas moléculas reduzem a tensão superficial, a concentração micelar crítica e a tensão interfacial de um meio contendo uma solução aquosa e uma mistura de hidrocarbonetos. Estas propriedades geram microemulsões com as quais ocorre a formação de micelas onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água ou água em hidrocarbonetos. As propriedades de vários biosurfactantes têm sido extremamente revisadas (Cooper, 1986; Rosenberg et al., 1982; Kosaric et al., 1987). A estrutura dos biosurfactantes contém uma parte hidrofílica composta por aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, ou mono-, di-, ou polissacarídeos. A parte hidrofóbica é composta por estruturas saturadas, insaturadas ou ácidos graxos hidroxilados ou ainda peptídeos hidrofóbicos.

Devido as suas características, os biosurfactantes são extremamente utilizados em diversas indústrias, tais como alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos, química, sendo a de petróleo uma das mais importantes. Nesta, eles são uma alternativa atrativa, sendo utilizados em recuperação avançada de óleo, limpeza de tanques e equipamentos, tratamento de acidentes decorrentes de derramamento de óleo, emulsificação de óleo e na quebra de emulsões óleo/água e água/óleo. Sua utilização *in situ* e *ex situ* na recuperação avançada de óleo vem despontando como alternativa importante em situações específicas.

Remediação microbiana, biorremediação de hidrocarbonetos contaminantes, é uma tecnologia emergente envolvendo a aplicação de biosurfactante. Biodegradação de hidrocarbonetos por populações microbianas nativas é um mecanismo primário pelo qual hidrocarbonetos contaminantes são removidos do meio ambiente, sendo que a adição de biosurfactante com o intuito de estimular a população bacteriana nativa a degradar hidrocarbonetos acarreta um incremento na taxa de recuperação ambiental quando adota-se a biorremediação por biodegradação.

A capacidade do biosurfactante emulsificar misturas de hidrocarbonetos/água tem sido muito bem documentada. Esta propriedade tem sido demonstrada pelo aumento significativo de degradação de hidrocarbonetos e por isso utilizado na biorremediação de solos e mananciais contaminados (LOBATO, 2000).

Reservatórios de óleo oferecem condições onde alguns microrganismos podem se desenvolver e estes, quando isolados e cultivados em laboratório, podem ser caracterizados quanto à produção de surfactantes. Através de métodos específicos, microrganismos podem ser selecionados e utilizados para a formação de um banco de culturas com potencial aplicação na recuperação do meio ambiente e na recuperação avançada de óleo.

Neste trabalho, isolou-se microrganismos de poços de petróleo e selecionou-se, dentre os isolados, os produtores de biosurfactantes para formação de um banco de culturas com potencial aplicação no tratamento de acidentes ambientais e na recuperação avançada de óleo. Dentre os microrganismos selecionados, escolheu-se um para se fazer o estudo cultivando-o em meio contendo sacarose adicionado de petróleo, com os objetivos de: a) acompanhar a produção de biosurfactante, através da medida da tensão superficial, dentro das condições estabelecidas, composição do meio, temperatura, tempo e agitação; b) avaliar a produção de biomassa do microrganismo por densidade óptica da cultura em espectrofotômetro e o consumo de substrato pelo método DNS.

## 2. Material e Métodos para o Teste de Produção de Biosurfactantes

### 2.1. Meio de Cultura

Meio E modificado (g/L): Sacarose;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,25. Em tampão fosfato 100mM, pH 7,0 adicionou-se 1mL/L de uma solução estoque dos seguintes sais (g/100mL): EDTA - 0,01;  $\text{MnSO}_4$  - 0,3;  $\text{FeSO}_4$  - 0,01;  $\text{CaCl}_2$  - 0,01;  $\text{CoCl}_2$  - 0,01;  $\text{ZnSO}_4$  - 0,01.

### 2.2. Preparação do Inóculo

Foi selecionada a cepa A por apresentar o maior halo dentre as isoladas, 12 mm de diâmetro. A partir do meio E modificado foi preparado o inóculo, onde alçadas oriundas do meio de manutenção foram inoculadas em Erlenmeyer com capacidade para 500mL, contendo 150mL de meio. Os frascos permaneceram sob agitação de 250 rpm e 38°C durante 24 horas, sendo a cultura então utilizada como inóculo nos testes de produção de biosurfactantes.

### 2.3. Testes de Produção de Biosurfactantes

Estes testes foram realizados com o intuito de se estudar a produção de biosurfactantes pelos microrganismos dentro das condições ótimas para tal (aerobiose e presença de hidrocarbonetos), o que fornece indícios da produção de biosurfactantes pela linhagem selecionada. Inicialmente fez-se um teste com um meio contendo apenas sacarose e posteriormente fez-se outro teste onde foi adicionado petróleo bruto.

Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyer de 250mL, contendo 100mL do meio E modificado (adicionando-se petróleo para o segundo experimento). Foi adicionado ao meio uma alíquota do inóculo, e colocados no shaker a 250 rpm e 38°C por um período estabelecido. Frascos controles (não inoculados) foram introduzidos. Nas primeiras 12 horas foram retiradas amostras de 4 em 4 horas, em seguida foi aumentado o intervalo de tempo. Com estas amostras foram realizadas análises para o acompanhamento da variação da biomassa e da tensão superficial.

## 2.4. Tensão Superficial

A amostra retirada do shaker foi centrifugada numa centrífuga (5410 Eppendorf) a 14.000 rpm. Com o sobrenadante foi realizada a medida da tensão superficial pelo método do anel no tensiômetro Du-Nuoy (CSC Scientific Company, INC.).

## 2.5. Biomassa

A biomassa foi determinada medindo-se a densidade ótica das amostras bruta a 600 nm (OD600), uma vez que a concentração celular foi determinada como função da densidade ótica, onde  $C \text{ (g/L)} = 0,0031\text{OD}600$  (Lin et al., 1990).

## 2.6. Consumo de Substrato

O método do DNS (1,2), baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada, lida espectrofotometricamente em 600nm.

O método do DNS para a determinação de açúcares redutores é composto dos seguintes reagentes: ácido dinitro-salicílico, sal de Rochelle, fenol, bissulfito de sódio e hidróxido de sódio, sendo que cada um tem uma finalidade específica.

- Sal de Rochelle (solução de tartarato de sódio de potássio –  $C_4H_4O_6KNa.4H_2O$ ) usado para prevenir o reagente da ação do oxigênio dissolvido.
- Fenol – aumentar a quantidade de cor produzida.
- Bissulfito – estabilizante da cor obtida na presença do fenol
- Hidróxido de sódio – redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitro-salicílico.

Para determinar o consumo de substrato pelo método DNS:

- 1) Construiu-se a curva padrão de glicose + frutose;
- 2) Hidrolisou-se o meio;
- 3) Adicionou-se o reagente DNS;
- 4) Determinou-se a absorbância por espectrofotômetro e
- 5) Levou-se o valor encontrado da absorbância na curva de calibração para determinar a quantidade de açúcares redutores, expressos como glicose + frutose.

## 3. Resultados e Discussão para o Teste de Produção de Biosurfactantes

### 3.1. Curva Padrão para o DNS

A figura 1 mostra a curva padrão de glicose + frutose utilizada para determinar o consumo de substrato pelo método DNS.

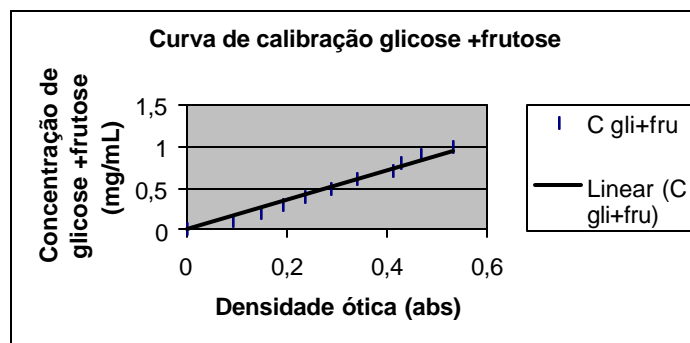


Figura 1. Curva de calibração glicose + frutose

Logo, a concentração de substrato em g/L pode ser determinada em função da densidade ótica pela relação  $S=1,8042D.O.$

### 3.2. Cultivo em Meio Contendo Sacarose

A figura 2 apresenta os resultados da variação da tensão superficial e concentração celular em função do tempo para o cultivo em meio contendo 1% de sacarose.

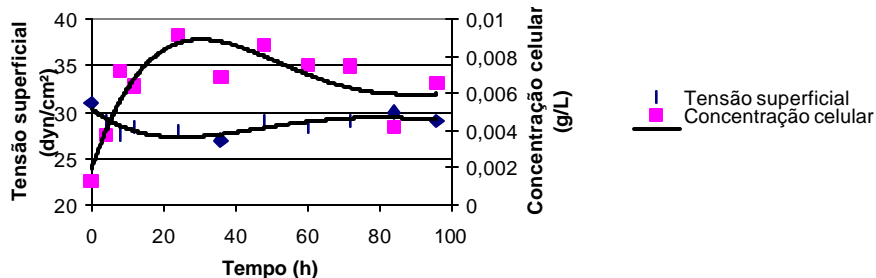


Figura 2. Tensão superficial e concentração celular em função do tempo para o cultivo em meio contendo sacarose.

No ensaio com meio contendo apenas sacarose observou-se que a produção da biomassa aumentou com o tempo caracterizando uma curva típica de crescimento microbiano, apesar da ausência da fase lag devido a anterior adaptação do microrganismo ao inóculo, uma vez que, o mesmo possui composição semelhante ao meio inoculado.

Analizando indiretamente a produção de biosurfactantes pela medida da tensão superficial, verificou-se uma redução da tensão nas primeiras 12 horas de cultivo e um comportamento constante desta variável após as 12 horas. Com isso não foi possível acompanhar a produção de biosurfactantes após as 12 horas de cultivo, uma vez que se atingindo a concentração micelar crítica não se verifica queda na tensão superficial do meio. Isto não significa que não haja produção de biosurfactantes, mas que esta produção não mais vai influenciar na tensão por não haver mais formação de micelas.

A figura 3 apresenta o crescimento da biomassa e o consumo de substrato em função do tempo para o cultivo em meio contendo apenas sacarose.

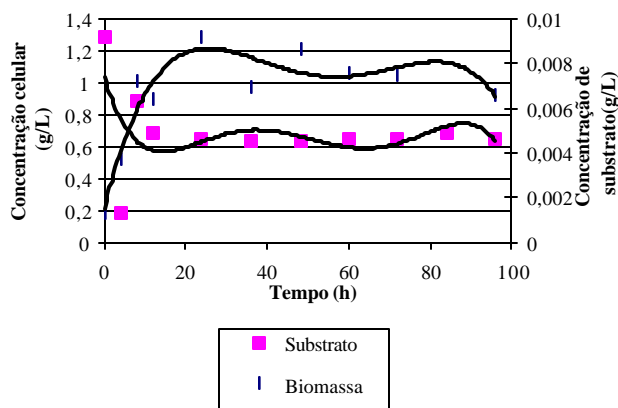


Figura 3. Biomassa e substrato em função do tempo para o cultivo em meio contendo apenas sacarose.

Pela figura 3 verifica-se que o maior consumo de substrato se deu na fase exponencial de crescimento celular, o que era esperado, pois nesta fase ocorre uma maior atividade metabólica da célula. Observa-se ainda que após esta fase o crescimento tende a um patamar e o consumo também se mantém constante.

Neste ensaio, o fator de conversão substrato a célula foi baixo,  $Y_{XS} = 0,0082$ , o que resulta em uma alta concentração de açúcar residual, provavelmente devido à baixa concentração celular no inóculo.

### 3.3. Cultivo em Meio Contendo Sacarose e Petróleo

A figura 4 apresenta os resultados obtidos da tensão superficial e concentração celular em função do tempo para o cultivo em meio contendo 1% de sacarose e 1% de petróleo.

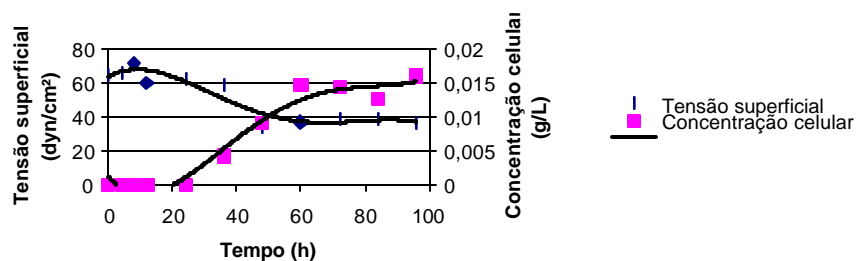


Figura 4. Tensão superficial e concentração celular em função do tempo para o cultivo em meio contendo sacarose e petróleo.

No ensaio contendo petróleo, observou-se pela curva de crescimento microbiano a presença de três fases distintas, a fase lag, a exponencial e a estacionária. A presença da fase lag dar-se devido à mudança no meio, no meio de preparo do inóculo não havia petróleo, já o meio do ensaio propriamente dito continha petróleo, resultando em uma necessidade de adaptação das células ao novo ambiente. Em relação à produção de biosurfactantes, verificou-se um aumento desta produção detectada pela boa redução da tensão superficial do meio. Ao analisar as curvas de formação de produto e produção de biomassa, há um indicativo de que a produção de biosurfactantes está relacionada ao crescimento celular.

A figura 5 apresenta o crescimento da biomassa e o consumo de substrato em função do tempo para o cultivo em meio contendo sacarose e petróleo.

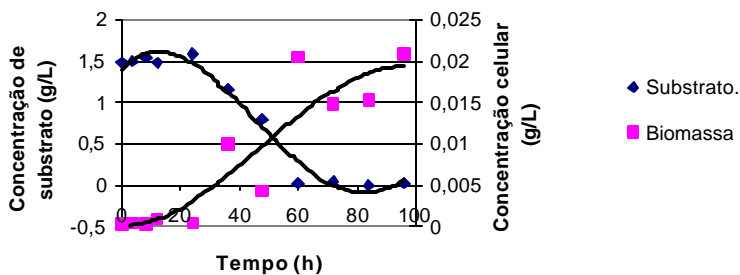


Figura 5. Biomassa e substrato em função do tempo para o cultivo em meio contendo sacarose e petróleo.

Com relação ao consumo de substrato, no ensaio contendo petróleo, figura 5, observa-se que o substrato foi consumido completamente. Apresentando um significativo fator de conversão  $Y_{X/S} = 0,0217$ .

Comparando a variação da tensão nos dois ensaios, verifica-se que no ensaio com petróleo conseguiu-se uma redução de 39% na tensão superficial, o que indica uma boa presença de biosurfactante no meio. Conforme observou-se no ensaio contendo apenas sacarose, a presença de biosurfactante foi bem inferior, observando-se uma variação na tensão superficial de apenas 6,5%. Isto sugere que a presença de óleo funciona como indutor à síntese do biosurfactante. Salientando-se ainda que a presença de óleo eleva a tensão superficial no início do cultivo.

#### 4. Conclusões

Em cultivos submersos com meio contendo sacarose e sacarose-petróleo, verificou-se um bom desempenho da cepa testada, bem como observou-se um bom indicativo da presença de biosurfactante no ensaio com meio sacarose-hidrocarboneto. Tal observação foi verificada através do acompanhamento da tensão superficial do meio ao longo do cultivo. Vale salientar também que o comportamento da tensão superficial e da variação da biomassa sugere que a síntese de biosurfactante está associada ao crescimento celular.

## 5. Agradecimentos

Ao CTPetro/FINEP, ao CNPQ e à Agência Nacional de Petróleo pela ajuda financeira. Ao PRH-ANP 14 e, particularmente à ANP por incentivar os estudos na área de Petróleo e Gás natural. À Petrobras UN-RNCE pelo apoio.

## 6. Referências

- COOPER, D. G. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.*, n. 3, p. 145-149, 1986.
- KOSARIC, N., CAIRNS, W. L., GRAY, N. C. C. *Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, v. 25, 1987.
- LIN, S.-C., GOURSAUD, J.-C., KRAMER, P. J., GEORGIU, G., SHARMA, M. M. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. In: *Microbial Enhancement of Oil Recovery-Recent Advances* (Donaldson, E. C., Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 219-226, 1990.
- LOBATO, A. K. C. L. Estudo Cinético da Síntese de Biosurfactantes. *Projeto de Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, 2000.
- ROSENBERG, E., ROSENBERG, M. GUTNICK, D. L. Adherence of bacteria to hydrocarbons. *Proceedings of the International Conference on Microbial Enhancement of Oil Recovery*, Conf. - 8205140, Shangri-la, Afton, Oklahoma, p. 20-28, 1982.