

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES PARA REMEDIAÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM PETRÓLEO E DERIVADOS

Adriano Henrique Soares de Oliveira, Juliana Aguilar Guimarães
João José Hiluy Filho & Ada Amélia Sanders Lopes

Universidade Federal do Ceará - Departamento de Engenharia Química,
Campus do Pici, Bloco 709, CEP: 60455-760, Fortaleza - CE - Brasil;
Fone: +85.288-9611, Fax: +85.288-9601, e-mail: hiluy@ufc.br

Resumo - Biossurfactantes são emulsificadores de hidrocarbonetos produzidos por algumas bactérias, bolores e leveduras. São polímeros que formam micelas que se acumulam na interface entre líquidos de diferentes polaridades. O presente trabalho tem por objetivo estudar o desenvolvimento do processo de produção e aplicação de microrganismos de ação surfactante destinados à utilização na indústria de petróleo, prioritariamente em problemas envolvendo borras dos tanques de estocagem, e está desenvolvida em três diferentes estágios: inoculação da cepa de *Acinetobacter iwoffii*, crescimento da bactéria em caldo nutritivo e fermentação num meio específico. Utilizou-se para efeito de comparação de rendimento três tipos de substratos: o etanol, o glicerol e o querosene durante a fermentação. Foram avaliados os potenciais surfactante através do índice de emulsificação com biomassa em suspensão e a execução de ensaios em procedimentos de limpeza de borras de tanques. Resultados preliminares indicam que a produção de biossurfactante por fermentação utilizando *Acinetobacter iwoffii* pode ser um processo viável, uma vez que os índices de emulsificação obtidos se mostraram satisfatórios.

Palavra-Chave: Biossurfactante; Bioremediação; Emulsificantes.

Abstract - Biosurfactants are emulsifiers of hydrocarbons produced by bacteria, yeast and fungi. They are polymers that form micelles and stay at the interface between liquid of different polarities. This work aim to study the development of the biosurfactant production process and its application related to oil sludge. This research has been done in three different steps: the *Acinetobacter iwoffii* inoculation, its growth in a nutritive broth and the fermentation under specific conditions. It was used three different kind of substracts: ethanol, glycerol and kerosene for comparison. The surfactant potential was evaluated by the emulsification indexes with suspension biomass and efficiency tests with oil sludge. Preliminary results show that biosurfactant production by *Acinetobacter iwoffii* can be a feasible process due to the satisfactory emulsification indexes that have been obtained.

Key words: Biosurfactants Bioremediation; Emulsifiers.

1. Introdução

Tensoativos ou surfactantes constitui uma importante classe de produtos químicos amplamente utilizados. São substâncias que possuem ação superficial, devido às suas características anfífilas (presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos numa mesma molécula). As indústrias de medicamentos, alimentos, cosméticos, detergentes para roupas, agentes processadores de minério, entre outras, têm se beneficiado das propriedades dos agentes tensoativos. Nas últimas décadas a demanda por surfactantes aumentou cerca de 300% dentro da indústria química americana. Os tensoativos de origem microbiana ou biosurfactantes são uma alternativa viável aos tensoativos sintéticos (Fiechter, 1992), apresentando inúmeras vantagens em relação a estes: biodegradabilidade, baixa toxicidade e podem atuar em condições mais drásticas de temperatura ou pH (Banat et al., 2000). Estes agentes tensoativos biodegradáveis estão sendo utilizados em sistemas de controle de poluição do meio ambiente por derramamento de petróleo e seus derivados visto que aumentam a biodisponibilidade dos contaminantes (Bardi et al., 2000) e também como meio de aumentar a produção de poços de petróleo, limpeza de tanques, fabricação de películas ultrafinas, processamento químico de papel, etc.

Estas substâncias, denominadas biosurfactantes, são polímeros emulsificadores de hidrocarbonetos, produzidos por algumas bactérias, bolores e leveduras, sendo responsáveis pela formação de micelas que se acumulam na interface entre líquidos de diferentes polaridades como, por exemplo, água e óleo.

Um grupo de biosurfactantes de particular interesse é representado por produtos do metabolismo de bactérias do gênero *Acinetobacter*, e neste sentido, experimentos vêm sendo realizados com diferentes espécies deste gênero, bem como substratos e condições de cultivo variadas, visando à obtenção de emulsificantes cada vez mais eficientes.

Este trabalho tem por objetivo avaliar e comparar através de fermentações a atividade emulsificante e consequentemente, a produção do biosurfactante através de uma bactéria RAG-1.

2. Materiais e métodos

2.1. Crescimento do microrganismo e inoculação

A cepa de *Acinetobacter iwoffii* (RAG-1) utilizada foi cedida pelo professor David Gutnick, da Universidade de Tel-aviv e selecionada pela equipe do Prof. Dr. Flávio Tavares, da área de genética microbiana de Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).

O inóculo foi obtido em meio YEPD sólido (2% glicose, 1% extrato de levedura, 1% peptona e 1% ágar para contagem) segundo a técnica de espalhamento superficial com alça de Drigalski. Após 48 horas de incubação a 31°C, as colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para 500ml de meio YEPD líquido (semelhante ao YEPD sólido, porém sem o ágar) com a finalidade de um melhor crescimento, sob agitação em um *rotatory shake* durante 24 horas. Para início da fermentação, diluiu-se de 1:20 (v/v) em meio de cultura fresco.

A curva de crescimento do microrganismo foi feita utilizando o método de microscopia de contagem típica (câmara de Neubauer).

2.2. Preparação do meio de cultura

Foram utilizados dois diferentes meios para fermentação do microrganismo RAG-1. O primeiro constituiu-se de uma solução de macronutrientes mais fonte de carbono além de outra composta de micronutrientes, “Trace Metals”, e um segundo, caldo nutriente padrão, com as seguintes composições:

- Meio para crescimento RAG-1 (Gutnick et al., 1980): KH_2PO_4 - 1,834% (p/v); K_2HPO_4 - 0,6% (p/v); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02% (p/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,4% (p/v).

- Solução “Trace Metals”

Em 800mL de água destilada os seguintes componentes, na ordem determinada, são adicionados: EDTA (2,5g); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10,95g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0g); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,54g); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (392mg) [ou anidrido (251mg)]; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (250mg) e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (177mg).

Pequenas gotas de H_2SO_4 concentrado foram adicionadas para retardar a precipitação. A solução resultante foi esterilizada utilizando filtro de membrana e completou-se o volume final para 1000mL.

Após a esterilização do meio de crescimento do RAG-1 em autoclave a 121°C e a 1atm durante 15 minutos, acrescentou-se 1mL por litro da solução de “Trace Metals” e 2% como fonte de carbono (glicerol, querosene ou etanol).

-Caldo Nutriente (Oxoid): Extrato de carne 10g/L, peptona 10g/L, cloreto de sódio 5g/L.

Foi utilizada uma solução de concentração 25g/L esterilizada em autoclave a 121°C e 1atm durante 15 minutos.

2.3. Fermentação

Foram feitas cinco fermentações, cada uma com uma série de duas bateladas. Utilizou-se meio de crescimento para RAG-1, solução “Trace Metals” e três diferentes fontes de carbono (etanol, glicerol e querosene) como substrato para

cada fermentação. Controlou-se a temperatura e manteve-se a aeração constante. Uma bomba de aquário foi usada para fornecer aeração ao sistema e uma solução de permanganato de potássio 2,5% utilizada para esterilizar o ar. O pH inicial ficou em torno de 7,0.

Acompanhou-se a produção da substância resultante do metabolismo do *Acinetobacter iwoffii*, através da atividade emulsificante, durante um período de 78 horas. O esquema representativo do sistema é apresentado na Figura 1.

Recolheram-se alíquotas para determinação da densidade óptica e do índice de emulsificação com intervalos de 24 horas.



Figura 1. Sistema experimental utilizado para a produção de biossurfactante por fermentação em batelada.

2.4. Determinação da Densidade Óptica

O crescimento da cepa *Acinetobacter iwoffii* foi analisado através das amostras retiradas no curso da fermentação no meio de crescimento específico para RAG-1 com seus diferentes substratos. As Figuras 2, 3 e 4 indicam os resultados obtidos na determinação da densidade óptica para o crescimento da bactéria em etanol, glicerol e querosene, respectivamente. Um espectrofotômetro de marca SPECTRONIC® com comprimento de onda igual a 540nm foi utilizado para obtenção destes resultados.

2.5. Determinação do Índice de Emulsificação

Os isolados retirados no período da fermentação foram testados quanto ao Índice de Emulsificação. Este procedimento consistiu em colocar uma alíquota de amostra retirada do fermentador em tubo de ensaio, com fundo chato, adicionando o mesmo volume de querosene (marca comercial Jacaré) e 0,2mL de corante Rosa Bengala 0,1%. Agitou-se em vortex por um minuto em alta rotação (Cooper & Goldenberg, 1987; Maklar & Cameotra, 1997). Após 24 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada (He) e altura total (Ht). O teste do Índice de Emulsificação foi conduzido em triplicatas e os resultados estão na Tabela 1.

3. Resultados e discussões

Os três substratos selecionados (etanol, glicerol e querosene) foram avaliados com relação à evolução quantitativa da biomassa e eficiência da emulsificação de óleo diesel. Embora todos os substratos tenham permitido o crescimento da *Acinetobacter iwoffii* e apresentado atividade emulsificante, o glicerol apresentou um maior rendimento nos dois aspectos. Os meios contendo o etanol e o querosene exibiram rendimentos semelhantes de biomassa e atividade emulsificante, observando-se uma discreta superioridade para o etanol.

Segundo Ururahy et al (1998), é possível que tenha ocorrido inibição pelo substrato e/ou efeito tóxico dos produtos resultantes do metabolismo bacteriano. As Figuras 2, 3 e 4 indicam de modo geral a relação direta entre o aumento da biomassa e o índice de emulsificação para os três substratos utilizados.

É importante ressaltar que o valor máximo da atividade emulsificante foi determinado com relação a cultura, isto é, a substância biossurfactante não foi ainda isolada e purificada, portanto tais índices tendem a aumentar após estas etapas.

Para a otimização do processo, experimentos anteriores demonstraram o efeito positivo da aeração no rendimento para produção do biossurfactante.

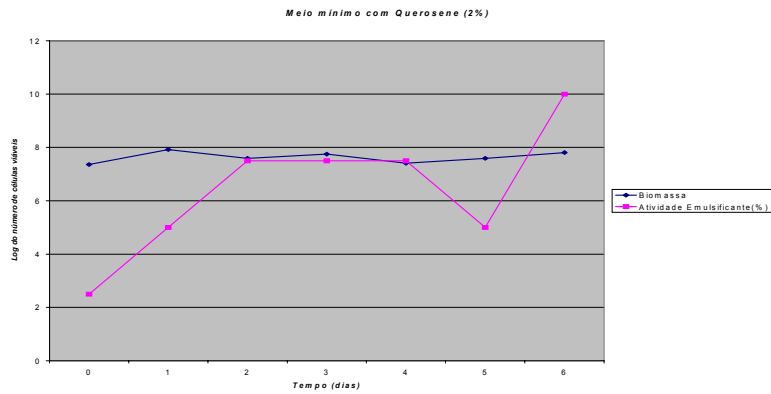


Figura 2. Crescimento Bacteriano e atividade emulsificante no meio etanol

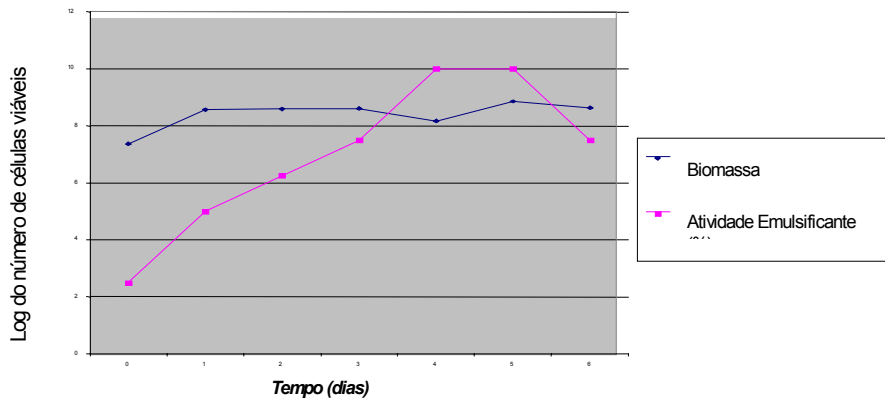


Figura 3. Crescimento Bacteriano e atividade emulsificante no meio glicerol

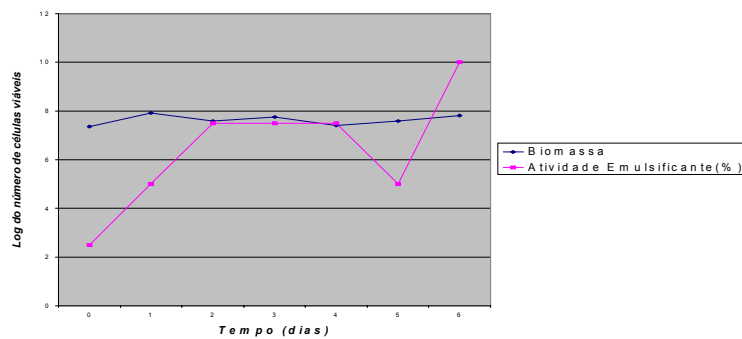


Figura 4. Crescimento Bacteriano e atividade emulsificante no meio querosene.

Foram feitas ainda fermentações em batelada com o caldo nutritivo padrão para efeito comparativo ao meio de cultura para RAG-1, conforme os resultados mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Índice de emulsificação (IE%) através da fermentação em caldo nutritivo (Batelada 1)

Amostra	Tempo (h)	He (m)	Ht (m)	IE(%)	IE(%) (médio)
---------	-----------	--------	--------	-------	---------------

A1	0	0,8/1,0/1,4	2,3/2,5/2,8	34,8/40,0/50,0	41,6
B1	24	2,0/2,8/1,7	3,6/3,2/3,2	55,5/87,5/53,2	54,4
C1	48	0,7/0,5/0,5	2,3/2,2/2,1	30,4/22,7/23,8	25,6
D1	72	0,7/0,4/0,3	3,4/3,2/2,5	20,6/12,5/12,0	15,0
E1	96	2,1/0,3/2,3	4,3/2,3/4,8	48,8/13,0/47,9	48,4

Tabela 2. Índice de emulsificação (IE%) através da fermentação no meio de crescimento para RAG-1 (Batelada 2)

Amostra	Tempo (h)	He (m)	Ht (m)	IE(%)	IE(%) (médio)
A2	0	0,4/1,0	2,0/3,0	20,0/33,3	26,7
B2	24	1,4/1,3/1,4	4,0/3,5/3,6	35,0/37,1/38,8	37,0
C2	48	0,4/1,4/0,6	2,5/3,5/3,0	16,0/40,0/20,0	18,0
D2	72	1,9/2,1/1,6	4,0/4,3/3,8	47,5/48,8/42,1	46,1
E2	96	2,3/2,4/2,4	5,0/4,8/5,0	46,0/50,0/48,0	48,0

Pode-se verificar que a princípio o caldo nutritivo seja mais vantajoso do que o meio utilizado para o microrganismo RAG-1, porém, este apresenta uma queda em sua atividade emulsificante com o passar do tempo. Por sua vez, o meio para RAG-1 apresenta um aumento na sua atividade emulsificante. Vale ressaltar que o caldo nutritivo por ser padrão favorece o crescimento de outros microrganismos, podendo facilmente contaminar o processo e conseqüentemente comprometer os resultados. Daí serem exigidos maiores cuidados quanto aos procedimentos de esterilização.

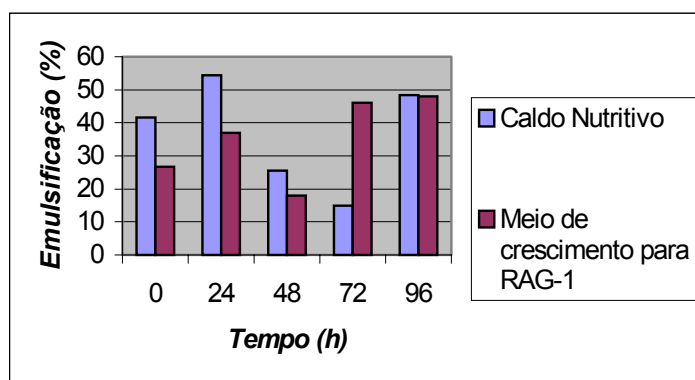


Figura 5. Comparação entre o Índice de Emulsificação utilizando biossurfactante produzido por células no caldo nutritivo e no meio de crescimento para RAG-1.

4. Conclusões

Os resultados obtidos sugerem a escolha do glicerol (2%), em condições controladas de temperatura, pH e aeração, como melhor substrato para uma produção em escala piloto de biossurfactantes.

A metodologia de medição do índice de emulsificação ainda está sendo avaliada, mas os resultados mostraram-se bastante satisfatórios de forma a validar os ensaios quantitativos, o que foi confirmado através dos ensaios de viscosidade.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Agência Nacional do Petróleo (ANP) e a CAPES pelo apoio, ao grupo de Bioconversão do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará e à equipe do Prof. Dr. Flavio César Almeida Tavares do Departamento de Genética da USP/ ESALQ.

6. Referências

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1992) - "Standard methods for the examination of water and wastewater.", 18. ed., Washington/D.C: APHA. AWWA. WEF.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1995) - "Standard methods for the examination of water and wastewater.", 19. ed., Washington/D.C: APHA. AWWA. WEF.
- BICCA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. , 1999, "Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*." *Revista de Microbiologia*, 30: 231-236.
- GUTNICK, D.L.; ROSENBERG, E.; BELSKY, I.; ZOSIM, Z.; SHABTAI, Y. (1980) "Extracellular microbial lipoheteropolysaccharides and derivation, their preparation and compositions combining them, and their use". Patent Number EP0016546.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 90 ed, Copyright, 787p.
- IQBAL, S; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. , 1995, "Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*." *Lett. App. Microbiol.* 21, p. 176-179.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHIMA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A RITCHKOVA, M. I. (2001), "Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction". *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 46, Issue 2 p.149 -156.
- URURAHY, A.F.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R.L.; GABARDO, I.T.; PEREIRA Jr., N., (1998). "Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste". *Rev. Microbiol.* v.29 n. 4, p. 1-10.