

**Copyright 2004, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP**

Este Trabalho Técnico Científico foi preparado para apresentação no 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, a ser realizado no período de 2 a 5 de outubro de 2005, em Salvador. Este Trabalho Técnico Científico foi selecionado e/ou revisado pela Comissão Científica, para apresentação no Evento. O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pelo IBP. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões do Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, Sócios e Representantes. É de conhecimento e aprovação do(s) autor(es) que este Trabalho será publicado nos Anais do 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás

---

## **PRODUÇÃO DE SURFACTANTE POR CONSÓRCIOS BACTERIANOS ISOLADOS DE SUBSTRATOS MARINHOS SOBRE A INFLUÊNCIA DE COMPOSTOS AROMÁTICOS**

Fernanda Savergnini<sup>1</sup>, Leandro V. Guerra<sup>1</sup>, Mabel A. Barcelos<sup>1</sup>, Mirian A. C. Crapez<sup>1</sup>.

1 Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense,  
Niterói, Brasil. Caixa Postal 100.644. Niterói, RJ. CEP: 24001-970. E-mail:  
fernandasavergnini@bol.com.br

**Resumo** – Os biossurfactantes reduzem a tensão superficial dos óleos, tornando-os miscíveis em água, sendo a produção desta substância a condição inicial para a degradação de hidrocarbonetos. Deste modo, o estudo da emulsificação é um passo fundamental para a aplicação futura desta tecnologia em programas de despoluição ambiental. Neste trabalho, consórcios bacterianos foram isolados e bioamplificados do biofilme de três talos algáceos e incubados com benzeno, tolueno e xileno. Os parâmetros estudados durante 0, 7, 15 e 30 dias foram carbono bacteriano e taxas de emulsificação (TE) nas fases não aquosa (A) e aquosa (B). Todos os testes foram realizados em triplicata, utilizando óleo Árabe Leve. Todos os consórcios apresentaram TE<sub>24h</sub> crescentes, fato que pode demonstrar a influência positiva dos compostos testados na incubação frente a seleção de bactérias hidrocarbonoclasticas. A maior TE<sub>24h</sub> (88%) foi conseguida pelo consórcio isolado da alga *Dictyota menstrualis* com 30 dias de incubação e crescida em tolueno. O biofilme bacteriano dos três talos algáceos estudados apresentou ação surfactante, caracterizada pelas emulsificações A e B, o que permitiria recuperar o óleo e seus derivados de ambientes impactados.

**Palavras-Chave:** consórcio bacteriano, surfactante, petróleo, alga

**Abstract** – The biosurfactants reduce tension superficial of the oils, becoming them soluble in water, been the production of this substance the initial condition for the hydrocarbons degradation. This way, the study of emulsifications a step fundamental for future application of this technology in environmental despollution programs. In this work, bacterial consortium were isolated and bioamplificated of three stem of algae and incubated with benzene, toluene and xylene. The tests realized during 0,7,15 and 30 days was bacterial carbon and emulsification rate (TE), in the aqueous phase (B) and in the phase not-aqueous (A). All tests were realized in three replicas, utilizing Árabe Leve oil. All consortium presents growing TE<sub>24h</sub>, it could demonstrate the positive influence of the substances testeds in the incubation for the selection of hydrocarbonoclastics bacterias. The greatest TE<sub>24h</sub> (88%) was of the *Dictyota menstrualis* with 30 days of incubation and growing in toluene. The bacterium biofilm of three algae studied present surfactant action, characterized by emulsifications A and B, fact that make possible the recuperation of environmental contaminated with oil and its derivatives compounds.

**Keywords:** bacterial consortium, surfactant, petroleum, algae

## 1. Introdução

A contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tem causado danos críticos ao ambiente e a saúde, uma vez que estas substâncias são solúveis em substâncias lipídicas (Crapez, 2001). Esses compostos afetam consideravelmente os organismos devido a interferirem nas propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares, tendo como algumas das alterações fisiológicas notáveis: comprometimento do sistema imune, comprometimento reprodutivo, câncer e até a morte. (Sikkema *et al.*, 1995)

Como consequência do fato de serem lipofílicos, os HPAs se ligam irreversivelmente aos componentes da matéria orgânica, tornando-se indisponíveis para os microrganismos removerem e/ou degrada-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 (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, pois se adaptaram a sintetizar produtos ativos de superfície (surfactantes), capacitando-as para absorção, emulsificação e solubilização de substâncias imiscíveis em água. (Healy *et al.*, 1996)

Surfactantes têm sido usados para diversos fins na indústria, por exemplo: como adesivos industriais; agentes de floculação, de solubilização e espumantes; de-emulsificadores e penetrantes. (Mulligan *et al.*, 2001). Comparados aos surfactantes não biogênicos, os biossurfactantes têm maior tolerância a variação de pH, temperatura e salinidade, são mais seletivos, menos tóxicos e biodegradáveis (Rahman *et al.*, 2002). O uso de biossurfactantes, capazes de emulsificarem as fases aquosa e não aquosa, potencializa a remoção de hidrocarbonetos de petróleo da camada superficial da coluna d'água, bem como os adsorvidos a solo e a sedimento marinho.

A diversidade de substratos que abrigam comunidades bacterianas, bem como a busca condições ideais para a produção de biossurfactantes, são áreas ainda a serem exploradas. Assim o objetivo deste trabalho é verificar a produção de biossurfactante por consórcios de bactérias coletadas de três talos de algas da Enseada do Forno – Armação dos Búzios (RJ).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Coleta, isolamento e manutenção de bactérias hidrocarbonoclásticas

Foram coletadas as algas *Dictyota menstrualis* (D), *Laurencia obtusa* (L) e *Caulerpa racemosa* (C) na Enseada do Forno – Armação dos Búzios (RJ) (22°45'42,4"S e 41°52'27,7"W). A enseada tem uma praia que preserva grande parte de suas condições naturais, pela ausência de influência antrópica local. Possuindo profundidade média de 12m e faixa de areia de aproximadamente 150m (Yoneshigue, 1985).

A metodologia utilizada para a extração de bactérias das macroalgas foi a proposta por Maurat em 2003, onde dois gramas do talo de cada espécie das macroalgas foram colocados em erlenmeyers de 125 mL contendo 10mL de água do mar previamente filtrada e esterilizada em autoclave (120°C por 30 minutos), sendo então levadas ao sonificador (Bransonic 3210-50/60Hz) por 5 minutos. As amostras das algas receberam choque térmico a 80°C e foram incubadas em meio contendo 5g/l uréia, 15g/l bactopectona e água do mar 75% a 37°C (Krepsky *et al.*, 2003) para a bioamplificação da biomassa.

### 2.2 Verificação da produção de biossurfactantes

A fim de verificar a existência de surfactantes, após o isolamento foi realizado o teste do colapso da gota, que consistiu em adicionar 10 ml do meio de cultura com 15 dias de incubação juntamente com uma gota do óleo Árabe Leve em tubos de ensaio rosqueados durante 98 horas.

Após o tempo estipulado da adição do óleo, pode-se perceber que ocorreram microemulsões, significando deste modo um resultado positivo para a existência de surfactantes. As bactérias dos tubos que apresentaram microemulsões mais eficientes foram selecionadas e colocadas para crescer em Erlenmeyers de 125ml sendo mantidas em triplicata com o meio de cultura e temperatura já referidos.

### 2.3 Influência de substâncias aromáticas (benzeno, tolueno e xileno) no crescimento e seleção de consórcios hidrocarbonoclásticos.

Para esta etapa do experimento colocamos os consórcios com vinte dias de incubação para crescerem sobre a influência dos compostos aromáticos, benzeno, tolueno e xileno nas concentrações de 5 mM cada um. A influência dos aromáticos no crescimento e seleção de consórcios hidrocarbonoclásticos foi verificada nos tempos: 0, 7, 15 e 30 dias de incubação, através da determinação do carbono bacteriano e das taxas de emulsificação respectivamente.

### 2.4 Determinação da biomassa bacteriana

Para a determinação do carbono bacteriano, uma alíquota de 0,5 ml da amostra foi retirada e sofreu uma diluição de 1:4 em 1,95ml de água deionizada estéril, adicionando-se 75µl da solução de laranja de acridina e filtrada em membrana Nuclepore. Este procedimento foi equivalente a uma diluição de 22x.

As células foram contadas em 10 campos, em triplicata, através do microscópio Axioskop, modelo 50 da Zeiss e com aumento de 1000 vezes. O número de bactérias foi calculado segundo Kepner *et al.* (1994) e a biomassa bacteriana segundo o método de Carlucci *et al.* (1986).

### 2.5 Taxa de Emulsificação

Foram medidas as taxas de emulsificação nas fases: Não-aquosa (A) e Aquosa (B). Para a realização deste teste foram colocados 4,0 ml da mostra bacteriana em tubos de ensaio rosqueados, em triplicata, adicionando-se 6,0 ml do óleo Árabe Leve como fonte de carbono (fig.1 ). Feito isso, os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto e a leitura realizada após 24 horas. As taxas de emulsificação foram estimadas segundo Paraszkiewicz, et al. (2002).

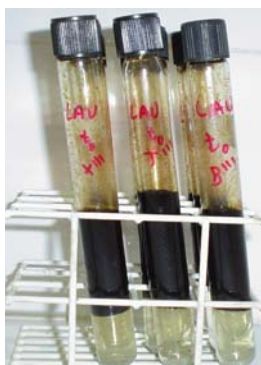


Figura 1. Foto do experimento da Taxa de Emulsificação com o consórcio extraído de *Laurencia obtusa* no T0

## 3. Resultados e Discussão

As emulsificações foram crescentes ao longo do tempo (Tabela 1), apesar do carbono bacteriano ter oscilado ao longo do experimento (Tabela.2). O consórcio de *D. menstrualis* obteve a maior taxa de emulsificação (88,14%) no T30, sendo incubada com o tolueno; o consórcio de *L. obtusa* obteve 70,37% no T15 incubada com o composto xileno e o consórcio de *C. racemosa* apresentou 62,35 no T30 sobre a influência do composto benzeno.

Tabela1: Emulsificação do Óleo Árabe Leve, pelos consórcios bacterianos de *Dictyota menstrualis*, *Laurencia obtusa* e *Caulerpa racemosa*, com 0, 7, 15 e 30 dias de incubação.

|                                      |            | TE <sub>24h</sub> (%) |       |       |       |
|--------------------------------------|------------|-----------------------|-------|-------|-------|
| Consórcio bacteriano                 | Substância | 0                     | 7     | 15    | 30    |
| <i>Dictyota menstrualis</i><br>( D ) | B          | 7,30                  | 19,54 | 37,63 | 52,86 |
|                                      | T          | 18,52                 | 29,63 | 51,06 | 88,14 |
|                                      | X          | 0                     | 17,22 | 79,18 | 71,47 |
| <i>Laurencia obtusa</i><br>( L )     | B          | 2,78                  | 1,37  | 45,51 | 33,56 |
|                                      | T          | 14,21                 | 16,08 | 52,02 | 48,00 |
|                                      | X          | 3,25                  | 26,21 | 70,37 | 55,32 |
| <i>Caulerpa racemosa</i><br>( C )    | B          | 4,57                  | 20,44 | 49,85 | 62,35 |
|                                      | T          | 4,33                  | 44,40 | 61,57 | 55,14 |
|                                      | X          | 25,57                 | 47,71 | 45,24 | 46,66 |

TE<sub>24h</sub>:Taxa de emulsificação total com 24 horas de repouso

Tabela2: Carbono orgânico bacteriano dos consórcios de *Dictyota menstrualis*, *Laurencia obtusa* e *Caulerpa racemosa*, com 0,7,15 e 30 dias de incubação.

| Consórcios da alga<br><i>Dictyota menstrualis</i> |      |      |      |      | Consórcios da alga<br><i>Laurencia obtusa</i> |      |      |      | Consórcios da alga<br><i>Caulerpa racemosa</i> |      |      |      |
|---------------------------------------------------|------|------|------|------|-----------------------------------------------|------|------|------|------------------------------------------------|------|------|------|
| COB (µgC/cm <sup>3</sup> )                        |      |      |      |      |                                               |      |      |      |                                                |      |      |      |
|                                                   | 0    | 7    | 15   | 30   | 0                                             | 7    | 15   | 30   | 0                                              | 7    | 15   | 30   |
| B                                                 | 0,36 | 0,16 | 0,13 | 0,33 | 0,21                                          | 0,24 | 0,20 | 0,37 | 0,34                                           | 0,29 | 0,25 | 0,34 |
| T                                                 | 0,33 | 0,22 | 0,27 | 0,37 | 0,18                                          | 0,31 | 0,21 | 0,25 | 0,32                                           | 0,42 | 0,31 | 0,21 |
| X                                                 | 0,33 | 0,17 | 0,30 | 0,17 | 0,17                                          | 0,17 | 0,27 | 0,26 | 0,30                                           | 0,21 | 0,32 | 0,22 |

Com relação a emulsificações nas fases: Aquosa (B) e Não aquosa (A) não houve uma diferença significativa de predominância da emulsão com relação aos consórcios isolados de *D. menstrualis* (Figura 2). Entretanto com relação aos consórcios de *C. racemosa* (Figura 3) e *L. obtusa* (Figura 4) houve predominância de emulsão na fase aquosa (B), quando incubados na presença de xileno. Os consórcios isolados de *L. obtusa* apresentaram 32,54% e 54,19%, já os consórcios isolados de *C. racemosa* apresentaram 7,74% e 84,52% nas fases A e B respectivamente.

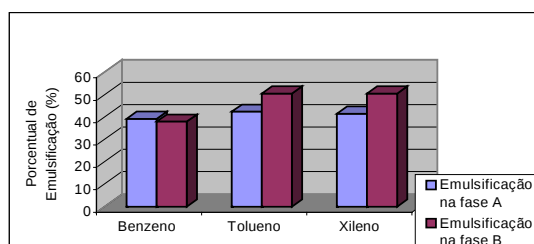


Figura 2: Tipo de emulsão predominante pelos consórcios bacterianos isolados da alga *Dictyota menstrualis*, incubadas com diferentes compostos.

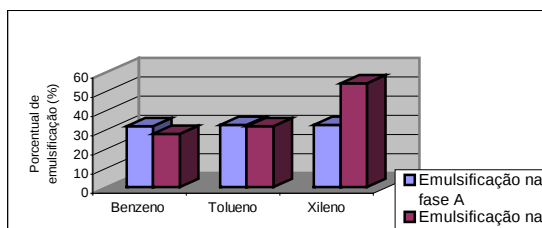


Figura 3: Tipo de emulsão predominante pelos consórcios bacterianos isolados da alga *Laurencia obtusa*, incubada com diferentes compostos.

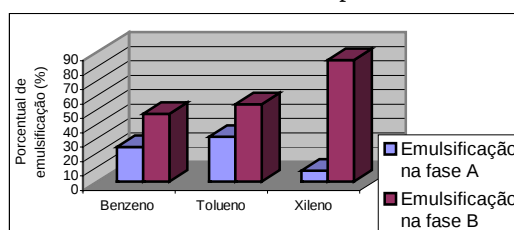


Figura 4: Tipo de emulsão predominante pelos consórcios bacterianos isolados da alga *Caulerpa racemosa*, incubada com diferentes compostos.

A biomassa bacteriana se manteve baixa ao longo de todo o experimento se comparado com a biomassa existente na literatura, o consórcio que apresentou maior biomassa ao longo do experimento foi o consórcio de *C. racemosa* incubado na presença de tolueno.

A biomassa encontrada neste experimento foi baixa se comparada com a de outros trabalhos. No atual trabalho, por exemplo, para se conseguir uma emulsificação de 88% com consórcios de *Dictyota menstrualis*, a biomassa foi de 0,37 µg C/cm<sup>3</sup>. No trabalho desenvolvido por Savergnini *et al* (2003), a biomassa para se obter uma emulsificação de 100% e 96% foi de 2,463 e 4,206 µg C/cm<sup>3</sup>, respectivamente.

Não foi percebida uma correlação nítida entre a biomassa bacteriana e as TE<sub>24h</sub> no presente trabalho, apesar de na literatura muitas vezes o carbono bacteriano ser relacionado diretamente as taxas de emulsificação (Healy, 1996).

Pode-se observar que as TE<sub>24h</sub> foram crescentes ao longo do tempo simbolizando que a incubação com BTX foi eficiente na aclimação e seleção das bactérias hidrocarbonoclásticas, assim, como foi visto no experimento de Maliyekkal *et al.* (2004): onde a incubação de bactérias com BTX aumentou significativamente a degradação frente substâncias menos tóxicas.

Percebe-se que os dados da literatura são em geral de emulsificações menores quando comparadas com as taxas obtidas pelos consórcios extraídos das algas em questão. Um exemplo disto é a taxa de emulsificação de 12% conseguida por Cassidy e Hudak (2001), com bactérias Gram-positivas, utilizando óleo diesel como fonte de carbono.

Nossos resultados demonstraram a capacidade do surfactante produzido em emulsionar o petróleo e o seu possível uso nos processos de biorremediação.

## 7. Agradecimentos

Ao apoio financeiro do Programa de Recursos Humanos -11 da Agência Nacional do Petróleo.



## 8. Referências

- CARLUCCI, A.F., CRAVEN, D.B., ROBERTSON, D. J. e WILLIAMS, P.M. Surface-film microbial populations diel amino acid metabolism, carbon utilization and growth rates. *Mar. Biol.*, v. 92: 289-297p., 1986.
- CASSIDY, D. P. e HUDAK, A. J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *J. Haz. Mater.*, v. B84: 253- 264p., 2001.
- CRAPEZ, M. A.C. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na microbiota marinha. In: Efeitos dos poluentes em organismos marinhos. (R. Moraes et al eds.) *Arte e Ciencia – Vilipress*, 253-267p., 2001.
- HEALY, M. G.; DEVINE, C.M.; MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, v.18: 41-57p., 1996.
- KEPNER JR. e R. PRATT, J.R. Use fluorochromes for direct enumerations of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbio. Rev*, v.58, 603-615p., 1994.
- KREPSKY, N. Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclásticos. Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, 119p, 2003.
- MALIEKKAL, S.M., RENE, E. R., PHILIP, L. Swaminathan, T. Performance of BTX under substrate versatility conditions. *Journal of Hazardous Materials* v. 109: 201-211p., 2004.
- MULLIGAN, C. N.; R. N. And GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal Hazardous Materials* v.85: 111-125p., 2001.
- PARASZKIEWICS, K., KANWAL, A. e DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotech.*, v.92: 287-294p., 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, cori pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource. Technology*, v. 81: 25-32p., 2002.
- SAVERGNINI, F., CRAPEZ, M. A.C., GUERRA, L. V., BITENCOURT, J. A. P., KREPSKY, N., SILVA, F. S., LAMEGO, L. S. R. Emulsificação do óleo Árabe Leve, querosene e gasolina por consórcios bacterianos isolados dos talos de *Caulerpa racemosa*, *Dictyota menstrualis* e *Laurencia obtusa*. IX ENAMA, 129p, 2004.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. e POOLMAM B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. v.59, nº2, 201-222p.1995.
- YONESCHIGUE, Y. Taxonomic et ecologie des algues marines dans region de Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brèsil). These. Doc. Sci. Luminy. Univ. Aix.-Maeseille II, 466p, 1985.