

6º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

ESTUDO DA APLICABILIDADE DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* LAMI005 EM BIORREMEDIAÇÃO *in situ*.

AUTORES:

ÍTALO WALDIMIRO LIMA DE FRANÇA, JULIANA ALVES MINEIRO APOLONIO, DIANA BEZERRA, DARLANE WELLEN FREITAS DE OLIVEIRA, VANIA MARIA MELO E LUCIANA ROCHA BARROS GONÇALVES

INSTITUIÇÃO:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás- 6º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás-ABPG, no período de 09 a 13 de outubro de 2011, em Florianópolis-SC. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 6ºPDPETRO.

ESTUDO DA APLICABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* LAMI005 EM BIORREMEDIAÇÃO *in situ*.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the potential of *Bacillus subtilis* in producing biosurfactant by submerged fermentation and study the application of this tensoative on bioremediation. *Bacillus subtilis* LAMI005 strain was isolated from the tank of Chlorination at the Wastewater Treatment Plant on Campus do Pici in Federal University of Ceará. In optimal conditions, this microorganism produces surfactin, which is an efficient tensoative. In this work, glucose and fructose were used as carbon source, which are the mainly components of the cashew apple juice. Around 460 mg.L⁻¹ of surfactin was produced, which promoted a reduction in the superficial tension of the fermented broth free of cells of about 57%. The stability of biosurfactant produced against high concentrations of NaCl (from 0 to 20% m/v) and temperature was studied. Also, the capacity of *Bacillus subtilis* of degrading petroleum was evaluated. The biosurfactant presented itself as a good alternative to be used in bioremediation since it was stable at high concentrations of NaCl, at high temperatures and it seemed to contribute to the degradation of petroleum.

Introdução

As atividades relacionadas à indústria do petróleo envolvem grandes riscos ambientais, face à possibilidade de contaminação do ar, dos solos e das águas por uma gama de compostos orgânicos altamente poluentes. Os riscos vão desde a extração até o consumo, sendo que, os danos mais graves acontecem, geralmente, durante o transporte de combustível, devido a vazamentos de oleodutos e navios petroleiros. Atualmente, as soluções mais freqüentemente utilizadas para resolver problemas de derramamento de óleo compreendem a utilização de substâncias químicas dispersantes, coagulantes e/ou uso de redes de contenção de óleo. Contudo, essas práticas além de não serem muito eficientes, são de alto custo. Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos (ou de seus produtos) capazes de degradar o petróleo e/ou seus derivados. (Rocha *et. al.* 2007).

Biossurfactantes ou surfactantes microbiológicos constituem uma série de espécies químicas com propriedades tensoativas similares aos surfactantes químicos. São produzidos extracelular ou como parte da membrana celular de bactérias, leveduras e fungos, apresentando-se como substância promissora por apresentarem biodegradabilidade e eficiência em condições extremas de pH, temperaturas e força iônica, além de baixa toxicidade (Banat *et al.*, 2000). Essas vantagens em relação aos surfactantes químicos concernem aos biossurfactantes uma maior gama de aplicações, como uma abertura na indústria farmacêutica e alimentícia. Espera-se que num futuro próximo haja a substituição dos surfactantes químicos pelos microbiológicos. Elevados custos na produção de biossurfactantes tem estimulado análises na otimização de processos fermentativos que visam à formação destes produtos. *Bacillus subtilis*, isolado do Tanque de Tratamento do *Campus do Pici*, mostra-se um microrganismo satisfatório na produção de biossurfactantes, tendo em vista a ausência de patogenicidade, fato que amplia ainda mais o campo de aplicação.

Os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produz menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (Nitschke e Pastore, 2002). Segundo Mulligan e Gibbs (1993), a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg.L⁻¹, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em tomo de 1 e 30 dina.cm⁻¹ respectivamente.

De acordo com Santa Anna (2002), a indústria petrolífera é o maior mercado para a utilização de biossurfactantes. Estes agentes tensoativos biodegradáveis vêm sendo utilizados em sistemas de controle de poluição do meio ambiente em derramamentos de petróleo e seus derivados, visto que aumentam a biodisponibilidade dos contaminantes (Desai e Banat, 1997). Além desta aplicação, podem ser utilizados como meio para aumentar a produção de poços de petróleo, limpeza de tanques, fabricação de películas ultrafinas, processamento químico de papel, etc. (Nitschke e Pastore, 2002). As indústrias de medicamentos, alimentos, cosméticos, detergentes para roupas, agentes processadores de minério, entre outras, também têm se beneficiado das propriedades dos agentes tensoativos (Rocha *et al.* 2007).

A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumentam a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes.

O objetivo deste trabalho consistiu na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, avaliação da capacidade tensoativa, estudo da estabilidade salina e térmica do produto formado e avaliação da capacidade degradadora de petróleo do microrganismo estudado.

Metodologia

Microrganismo: *Bacillus subtilis* LAMI005 foi previamente isolado de um tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (ETE-PICI). A linhagem foi identificada pela seguinte sequência de genes: 16S rRNA, cujo foi depositado no banco de genes com número de acesso de FJ143046.

Meio de cultura: A linhagem foi mantida em meio APGE (Giro *et al.*, 2009) e o ensaio foi realizado utilizando Meio Mineral (MM, Rocha *et al.* 2009) contendo glicose (10,0 g.L⁻¹) e frutose (8,5 g.L⁻¹), ambos grau analítico.

Inóculo: Três colônias de *B. subtilis* LAMI005 foram transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura (MM) e 0,1% de solução de elementos traço, estes foram incubados em shaker rotativo (Tecnal – TE240, São Paulo, Brazil) a 180 rpm a 30°C por 24 horas. O meio mineral foi esterilizado em autoclave por 10 min a 110°C.

Ensaio Fermentativo em shaker: Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, onde foram adicionados 100 mL de meio mineral, sob as condições de 30° C e agitação de 180 rpm. Foram retiradas amostras nos tempos de: 0, 6, 10, 14, 18, 21, 24, 33, 48, 72 horas, para posteriores análises.

Extração de surfactina: A extração de surfactina do meio fermentado livre de células foi realizada de acordo com metodologia descrita por Giro *et al.* (2009).

Métodos Analíticos:

Determinação da biomassa: O crescimento celular foi obtido por método indireto de turbidimetria pela medida da densidade óptica utilizando um espectrofotômetro de luz UV visível (*Genesys* série 20) a 600nm, conforme descrito em Giro *et al.* (2009).

Tensão superficial: Analisou-se o caldo fermentativo livre de células, com a utilização de um Tensiômetro (*Krüss* K6) a 30 °C, segundo a metodologia do anel De Nöuy (Costa *et al.*, 2006).

Índice de emulsificação (E24): Determinou-se a partir do caldo fermentado livre de células de acordo com a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987) e Desai e Banat (1997).

Concentração de surfactina: Foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), conforme descrito em Giro *et al.* (2009).

Concentração de Açúcares Redutores Totais: Glicose e frutose foram determinadas segundo metodologia de Rocha *et al.* (2007).

Concentração micelar crítica (CMC): Foi realizada através da quantificação da tensão superficial de sucessivas diluições de uma solução inicial rica em surfactina (biossurfactante produzido), de acordo com a metodologia de Santa Anna *et al.* (2002).

Estabilidade frente à força iônica: A estabilidade do biossurfactante frente a força iônica foi estudada variando-se a concentração de NaCl (0,5% a 20% m/v). Avaliou-se a estabilidade do biossurfactante bruto, dissolvendo uma concentração conhecida de sal em 50 mL de meio fermentador livre de células (ILORI *et al.*, 2005).

Estabilidade frente à temperatura: Variou-se a temperatura mantendo a solução contendo biossurfactante em banho termostático. Inicialmente a solução contendo biossurfactante foi mantida a 100° C por 15, 30, 60 e 75 minutos. Posteriormente, o meio foi exposto a temperatura de 120° C durante 15 minutos, em autoclave.

Degradação de Petróleo: Placas de Petri contendo areia (10 g), inóculo bacteriano e petróleo (1%) foram incubados a 30 °C por 20 dias. O controle negativo não possuía inóculo; após este período, as placas foram submetidas à análise macroscópica para observação da degradação do petróleo (Bueno *et al.* 2010).

Resultados e Discussão

Inicialmente, foi realizado ensaio em shaker para análise da produção de biossurfactante em meio mineral, utilizando glicose e frutose (Açúcares Redutores Totais – ART) como substratos. A Figura 1 apresenta os resultados de consumo de substrato, formação de produto, bem como crescimento celular e tensão superficial do meio fermentado, livre de células, em função do tempo de fermentação. A concentração inicial ART foi de aproximadamente 16,55 g.L⁻¹. A maior produção de surfactina (aproximadamente 460 mg.L⁻¹) ocorreu em 48 horas de fermentação. Não foi observada preferência do microrganismo pelo consumo de glicose ou frutose, ambos foram consumidos simultaneamente. Em termos de produção de biossurfactante, obteve-se um resultado satisfatório, quando comparados à Giro *et al.*, (2009), que em estudo cinético da produção de biossurfactante em biorreator utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em suco de caju e em meio mineral, obteve uma produção em torno de 123 mg.L⁻¹ em meio mineral suplementado com suco de caju e 232 mg.L⁻¹ em meio mineral utilizando glicose e frutose P.A. Observa-se uma redução da tensão superficial do caldo fermentado livre de células para 28 mN.m⁻¹, algo previsto pela característica do biossurfactante produzido, a surfactina, um dos biossurfactantes mais potentes (Giro *et al.* 2009). Essa redução foi de aproximadamente 48 % em relação ao início do ensaio. O pH manteve-se estável, na faixa entre 5,0 e 7,0.

A partir dos perfis temporais observados na Figura 1 foi possível a obtenção de parâmetros fermentativos, apresentados na Tabela 1. Valores para os parâmetros de conversão e velocidade específica máxima de crescimento foram similares aos obtidos por Martins *et al.* (2009), mas os valores de Y_{P/X} observado no presente trabalho foi maior, que foi de cerca de 0,017 para o mesmo meio mineral.

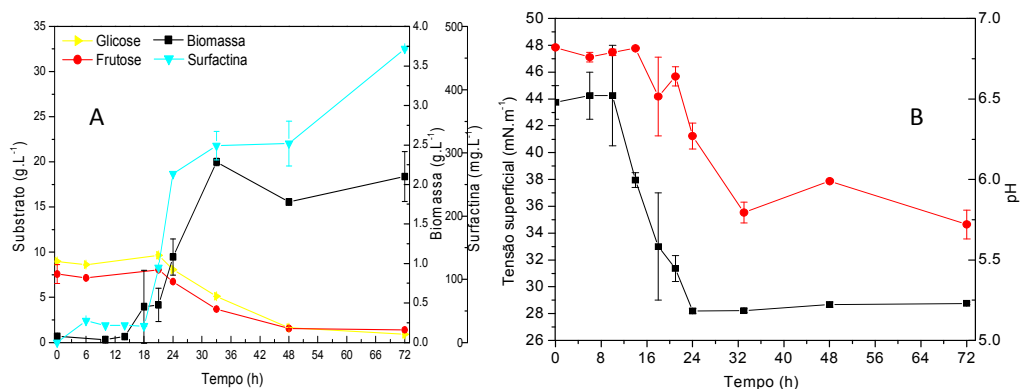


Figura 1 – Produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI 005 em agitador rotatório, à 180 rpm e 30 °C: (A) crescimento celular (■), consumo de substrato(▲/▼) e formação de produto(▼); (B) tensão superficial (■) e medida de pH (●).

TABELA 1 – Parâmetros cinéticos da produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI 005 em agitador rotatório, à 180 rpm e 30 °C:

S ₀ (g.L ⁻¹)	X _{MÁX} (g.L ⁻¹)	μ _{MÁX} (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	Y _{P/X} (g.g ⁻¹)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	P _{MÁX} (mg.L ⁻¹)	Tempo de fase lag (h)
16,55	2,29	0,1644	0,112	0,194	0,022	464,76	15

Determinou-se ainda a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante produzido, uma vez que este é um dos fatores que mostram a eficiência tensoativa de um surfactante (Sen *et. al.* 2005). A tensão da água foi reduzida de 70 mN.m⁻¹ para aproximadamente 31 mN.m⁻¹, quando o biossurfactante semi-purificado foi adicionado, representando uma redução de tensão da água de 57%. Obteve-se uma concentração micelar crítica de 14,12 mg.L⁻¹, valor próximo ao observado por Peypoux *et al.* (1999), que obteve CMC de 20 mg.L⁻¹. Resultado também satisfatório quando comparado à surfactina padrão comercial (Sigma – 98% de pureza), cuja CMC é de aproximadamente 13 mg.L⁻¹ (Sen *et. al.* 2005). Este baixo valor de CMC e a redução substantiva da tensão da água evidenciam a alta eficiência tensoativa do produto formado.

Posteriormente, foi realizada a análise da estabilidade do biossurfactante produzido frente à força iônica e temperaturas, visto que estas sejam possíveis condições na indústria petrolífera em que possa vir a utilizar o produto formado, sendo realizadas análises de tensão superficial e índice de emulsificação. Os resultados são apresentados na Figura 2. Observou-se, na Figura 2 (A), que não houve um aumento na tensão superficial, da solução contendo o biossurfactante, quando exposto as diferentes concentrações de cloreto de sódio, variando de 0 a 20 % (m/v). Este resultado é interessante quando se considera o uso do biossurfactante na biorremediação em ambientes salinos, como por exemplo, na recuperação de derramamentos de petróleo em ambientes marinhos (Rocha, 2007). Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl enquanto que concentrações salina de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (Nitschke e Pastore, 2002). Sabe-se que a adição de sal a uma solução contendo surfactante causa uma blindagem das forças de repulsão eletrostáticas existentes entre os grupos opostos. Este fenômeno favorece a micelização do surfactante (ocorre uma diminuição da cmc), e permite a formação de micelas maiores - maior número de agregação (Minatti *et. al.* 2007).

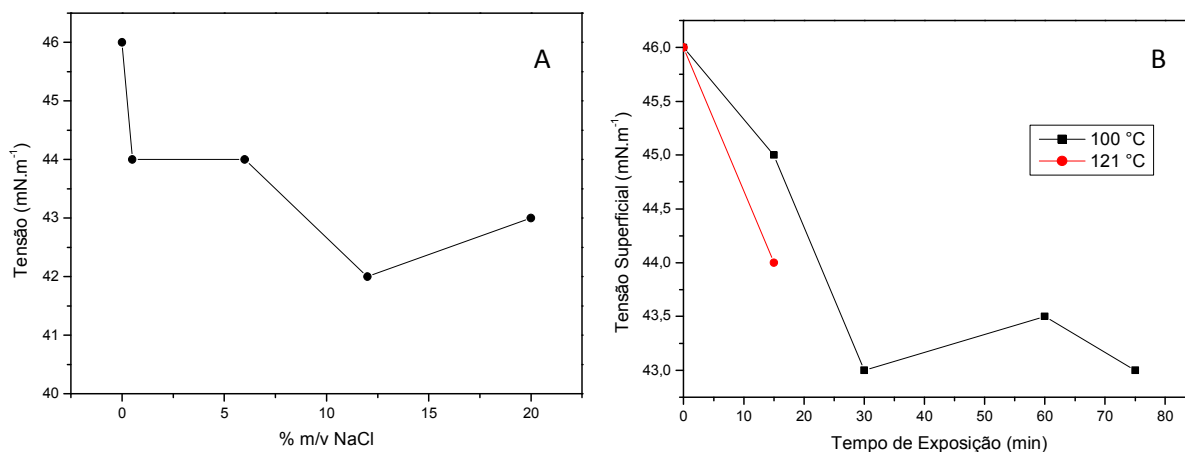


Figura 2 – Estabilidade do biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005 frente à força iônica (A) e temperatura (B).

Em relação aos resultados obtidos quanto ao efeito do tratamento térmico na atividade do biossurfactante (Figura 2 -B), pode-se observar que a tensão superficial diminuiu após exposição a altas temperaturas (100°C), por 75 minutos, ou quando submetida à esterilização em autoclave (121°C por 15 min).

Na Tabela 2 são apresentados os valores de E₂₄ em relação à estabilidade do biossurfactante. A fonte hidrofóbica utilizada foi o óleo de motor SAE 15W-40, que apresenta em sua composição considerável concentração de hidrocarbonetos parafínicos. Também foi realizada a emulsificação em petróleo bruto (Amostra da Bacia de Campos, cedida pelo Grupo de Pesquisa GPTA).

TABELA 2 – Índice de Emulsificação E₂₄

CONDIÇÃO	E ₂₄ (%)
Sem adição de sal e sem exposição à Temperatura	92,12
0,5 % m/v NaCl	85,29
6 % m/v NaCl	66,67
12 % m/v NaCl	60,71
20 % m/v NaCl	56,67
Autoclavado (121 °C por 15 min)	25,2
100 °C por 15 min	22,5
100 °C por 30 min	24,3
100 °C por 60 min	22,2
100 °C por 75 min	20,6
Emulsificação em Petróleo	53,3

Observa-se redução da capacidade emulsificante, à medida que foram aumentadas as concentrações salinas e o tempo de exposição a 100 °C, fato que não foi observado nas características tensoativas do biossurfactante estudado. Foi observada uma redução do E₂₄ para a condição salina, pois à medida que foi adicionado sal, houve redução do Índice de Emulsificação de 85,29% para 56,67%. Não foi observada uma redução tão brusca para a variação ao tempo de exposição à temperatura de 100 °C.

A Figura 3 apresenta uma imagem da emulsificação do petróleo utilizando solução de surfactina produzida neste trabalho, àquela que apresentou resultado satisfatório de E₂₄.



Figura 3 – Emulsão do biossurfactante produzido em petróleo.

Posteriormente foi realizada a análise de degradação de petróleo pelo microrganismo estudado, sendo que em uma das placas foi adicionado biossurfactante, para uma análise na contribuição da surfactina no processo de biorremediação. As imagens das placas são apresentadas na Figura 4.

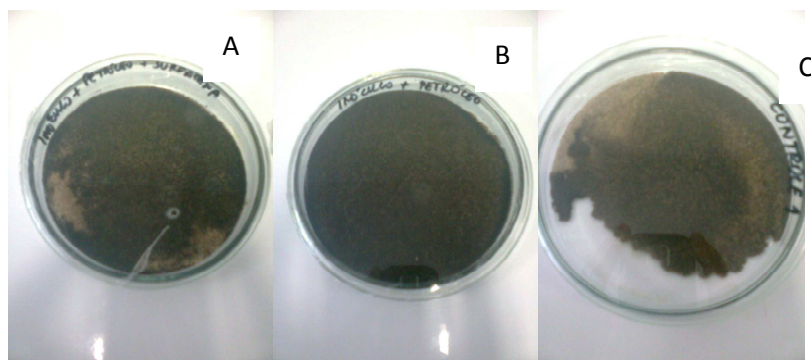


Figura 4 – Placas com: (A) Surfactina, petróleo e inóculo bacteriano em areia; (B) Petróleo e inóculo bacteriano em areia e (C) Petróleo em areia

Na placa C (Figura 4C), que foi adicionado apenas areia e petróleo, não foi observada nenhuma mudança, bem como na placa B (Figura 4B), mas neste caso ainda foi adicionado inóculo bacteriano. Observa-se que na placa em que foi adicionado biossurfactante, além de petróleo, areia e inóculo bacteriano (Figura 4A), houve indícios de degradação do petróleo, uma vez há regiões que apresentam uma diminuição da coloração escura, que é característica do petróleo. Acredita-se que houve uma redução da tensão superficial do petróleo, facilitando a ação do *B. subtilis* e de outros microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos, que estavam presentes na amostra de petróleo. É necessária uma série análises mais profunda para resultados mais conclusivos, como por exemplo, o teste do 2,6-diclorofenol-indofenol (HANSON *et. al.* 1993).

Conclusões

Após a realização dos experimentos, conclui-se que *Bacillus subtilis* LAMI005 mostrou-se um microrganismo promissor na produção de biossurfactante, produzindo aproximadamente 460 mg.L^{-1} de surfactina. A aplicação deste biossurfactante, cuja CMC foi de $14,12 \text{ mg.L}^{-1}$, foi responsável pela redução na tensão da água de 70 mN.m^{-1} para aproximadamente 31 mN.m^{-1} , sendo este um resultado satisfatório quando comparado à surfactina comercial.

As análises de estabilidade bem como a análise de degradação de petróleo, mostraram que tanto o biossurfactante produzido encontra-se adequado para utilização em biorremediação *in situ* de ambiente contaminados com hidrocarbonetos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a ANP, Agência Nacional do Petróleo, ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

Referências Bibliográficas

ROCHA, M. V. P., Produção de Biossurfactantes por Fermentação Submersa usando Substrato não convencional (2007). Tese (Mestrado em Engenharia Química) –Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants, *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.

MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: *Biosurfactants: production, properties, applications*. Kosaric, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 392-371, 1993.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA JR. N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promissing strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, p. 459-467, 2002.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 61, p. 47-64, 1997

Giro, M. E. A., Martins J. J. L., Rocha, M. V. P., Melo V. M. M. e Gonçalves L. R. B, Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. *Biotechnol. J.*, v. 4, 738-747. 2009

Bueno, S.M., Silva, A.N., Garcia-Cruz, C.H., Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Quím. Nova* vol.33 no.7 São Paulo 2010.

MARTINS, J. J. L.; OLIVEIRA, D. W. F.; GIRO, M. E. A.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo Cinético da Produção de Biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em Suco de Caju. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)*, Natal, RN, p.1-6, 2009.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.12, p. 370-375, 1999.

Minatti, E. Interação entre Polímeros e Surfactantes. TESE Doutorado.

Hanson, K.G.; Desai, J.D.; Desai, A.J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.*, 7, 745-748.

