

RITA DE CÁSSIA ROCHA FERNANDES

**HIDROFOBICIDADE CELULAR E BIOSURFACTANTES
COMO DETERMINANTES DA CAPACIDADE
DESEMULSIFICANTE DE ISOLADOS BACTERIANOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

XX

Fernandes, Rita de Cássia Rocha, 1963 -
Hidrofobicidade Celular e Biossurfactantes como
Determinantes da Capacidade Desemulsificante de
Isolados Bacterianos / Rita de Cássia Rocha
Fernandes. – Viçosa, MG, 2011.
x, 38f. : il.

Orientador: Arnaldo Chaer Borges
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

1. Petróleo - Microbiologia. 2. Agentes ativos de
superfície. 3. Microbiologia agrícola. 4. Bactérias. 5.
Emulsão
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

RITA DE CÁSSIA ROCHA FERNANDES

**HIDROFOBICIDADE CELULAR E BIOSSURFACTANTES COMO
DETERMINANTES DA CAPACIDADE DESEMULSIFICANTE DE ISOLADOS
BACTERIANOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 31 de março de 2011.

Prof. Wendel Batista da Silveira

Pesq. Adriano Guimarães Parreira

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof. Antônio Galvão do Nascimento
(Coorientador)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

A Deus, por me permitir essa conquista.

Aos meus filhos Paolo, Ana Luiza e Maria Cecília, pelo amor e a compreensão.

Aos meus irmãos pela amizade e incentivo.

Ao meu marido Marcos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom da fé.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, meu orientador, cujas palavras de apoio foram fundamentais para essa etapa de minha vida.

Ao professor, Antônio Galvão do Nascimento, pelos ensinamentos e pela amizade, a qual foi decisiva para a superação de obstáculos.

À professora Célia Alencar de Moraes, pelo incentivo à conquista desse título.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela amizade e exemplo de dedicação.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela amizade e apoio.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho.

Aos colegas de estudos: Paulo Miguel, Bruno Coutinho, Thamy Livia, Livia Colombo, Monalessa, Mônica Pacheco e Eliane Santos, pelos momentos de estudos e aprendizado.

À Rita de Cássia Picanço, pela amizade, indispensável ajuda e pelo bom funcionamento do laboratório.

Ao Karlos Kalks, pela análise de seqüenciamento das cepas utilizadas e pela disposição em me ajudar.

Aos companheiros de laboratório: Marcela Reis, Guilherme Santos, Patrícia Bernardes, Péricles Fernandes, Daniel Moraes, Carla Gabriela e Aline Daniela, pelos momentos de aprendizado e descontração.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia, Nilcéa e Elisabete, pela atenção e auxílio sempre que foi preciso sua ajuda.

Aos demais funcionários do Departamento de Microbiologia, cujo trabalho é essencial para o bom funcionamento da estrutura acadêmica e de pesquisa.

À Diana Magalhães, pela amizade, pelo apoio e pela ajuda valiosa na condução dos experimentos.

Aos meus pais, Rubens e Mônica (*in memoriam*), pelos ensinamentos.

Aos meus irmãos, por acreditarem em mim.

Aos meus Tios, Glorinha e Pedrinho, pelo exemplo de vida e sabedoria.

Aos meus filhos, os quais não me deixam fraquejar.

Ao Professor Marcos Tótola, pelo aprendizado e profissionalismo.

Ao Marcos, por tudo que fez para que eu pudesse chegar até aqui.

BIOGRAFIA

Rita de Cássia Rocha Fernandes, filha de Rubens Albano Fernandes e Maria Mônica Rocha Fernandes, nasceu em 31 de outubro de 1963, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em julho de 1988, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa. Foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial do CNPq, atuando em diversos projetos de pesquisa vinculados ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa

Em março de 2009, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, na área de Microbiologia Ambiental, tendo como orientador o professor Arnaldo Chaer Borges e como coorientador o professor Antônio Galvão do Nascimento.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESUMO

FERNANDES, Rita de Cássia Rocha. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Hidrofobicidade celular e biossurfactantes como determinantes da capacidade desemulsificante de isolados bacterianos.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Coorientadores: Antônio Galvão do Nascimento e Célia Alencar de Moraes.

A capacidade de culturas microbianas de desestabilizarem emulsões do tipo óleo em água (O/W) ou água em óleo (W/O), promovendo a separação de fases, é frequentemente atribuída a características como hidrofobicidade da superfície celular e a capacidade de produção de compostos com atividade surfactante e ação desemulsificante. Neste trabalho, foi avaliada a hipótese de que a capacidade de quebra de emulsões O/W ou W/O de isolados bacterianos está relacionada à hidrofobicidade celular e à produção de biossurfactantes com ação desemulsificante. As bactérias com capacidade desemulsificante foram isoladas a partir de composto de resíduo sólido urbano contaminado com óleo diesel, após enriquecimento em meio mineral contendo parafina líquida como fonte de carbono (MMSM-parafina). O agrupamento gerado com base no perfil de ácidos graxos dos 23 isolados obteve distinguiu a presença de doze linhagens bacterianas, das quais quatro foram eficientes para quebra de emulsão W/O, sendo a razão de quebra de emulsão maior que 70%. Essas bactérias foram identificadas como *Acinetobacter* sp. (LBBMA LU3 e LBBMA 7a) e *Pseudomonas mendocina* (LBBMA LU5b e LBBMA LU7b). Nenhuma

delas produziu biossurfactantes ou foi capaz de quebrar emulsão do tipo O/W. Os dados demonstram que a produção de biossurfactantes não é requerida para promover a quebra de emulsões W/O; contudo, indicam que esses compostos podem ser requeridos para a quebra de emulsões do tipo O/W. A capacidade de quebra de emulsão W/O diminuiu com o tempo de crescimento das culturas e foi dependente da presença de células com até 22 horas de cultivo em meio MMSM-parafina, não havendo influência de componentes do sobrenadante. Ao contrário, a atividade desemulsificante de culturas mais velhas e, em especial, a capacidade de separar a fase oleosa contida nas emulsões, foram atribuídas à presença de compostos desemulsificantes sem atividade surfactante. A atividade desemulsificante de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU3 aumentou linearmente com o aumento da temperatura, não sendo afetada por salinidade (até 150 g L⁻¹) ou pelo pH (3-8). Em algumas linhagens, foi observada a existência de uma possível interação entre células sedimentáveis e não-sedimentáveis numa mesma cultura, a qual determina a sua atividade desemulsificante. Na literatura especializada, não se encontra registro desse tipo de interação entre células distintas de uma mesma cultura bacteriana, em relação à sua atividade de quebra de emulsão W/O. Também, o efeito negativo de células não-sedimentáveis de algumas linhagens bacterianas sobre a separação da fase oleosa em emulsão W/O representa conhecimento novo para a área. A integridade das células de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU3 não é necessária para a atividade desemulsificante. A utilização de células de uma mesma linhagem bacteriana com diferentes valores de hidrofobicidade de superfície celular, obtidas durante a desnutrição em meio com carência de nitrogênio, revelou que inexistente uma relação única entre hidrofobicidade celular e capacidade de quebra de emulsão W/O. A hidrofobicidade celular correlaciona-se tanto positiva como negativamente com a capacidade de quebra de emulsão W/O e com a capacidade de separação de querosene contido na emulsão. Conclui-se, portanto, que outras características da superfície celular bacteriana, e não a sua hidrofobicidade, são determinantes para a sua atividade desemulsificante.

ABSTRACT

FERNANDES, Rita de Cássia Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2011. **Hidrofobicidade celular e biossurfactantes como determinantes da capacidade desemulsificante de isolados bacterianos**
Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Co-Advisers: Antônio Galvão do Nascimento and Célia Alencar de Moraes

The ability of microbial cultures to break oil in water (O/W) or water in oil (W/O) emulsions is often attributed to characteristics such as cell surface hydrophobicity and the production of surface active compounds with de-emulsification activity. In this study, we evaluated the hypothesis that the ability to break O/W or W/O emulsions of bacterial isolates depends on cell surface hydrophobicity and the production of biosurfactants with de-emulsification activity. Bacterial isolates possessing emulsion breaking activity were obtained from municipal solid waste compost contaminated with diesel oil, after enrichment in mineral medium with liquid paraffin as sole carbon source. Group analysis based on fatty acid profiles allowed us to distinguish the presence of twelve distinct bacterial strains among the 23 isolates originally obtained during the isolation. Among these, four were shown to be efficient in breaking W/O emulsion (emulsion breaking ratio > 70%). They were identified as *Acinetobacter* sp. (LBBMA LU3 and LBBMA 7a) and *Pseudomonas mendocina* (LBBMA LU5b AND LBBMA LU7b). None of the strains produced biosurfactants, nor was able

to break O/W emulsion. The data show that biosurfactant production is not required for W/O emulsion breaking; however, they do indicate that these molecules may be important for O/W emulsion breaking. W/O emulsion breaking activity decreased with culture age and was dependent on the presence of cells with up to 22 hours of growth in mineral-paraffin medium, with no influence of components secreted into the culture medium. By contrast, de-emulsification activity of older cultures and, in particular, the ability to separate the oil phase contained in W/O emulsions, were attributed to the presence of de-emulsifier compounds other than microbial surfactants. De-emulsification activity of *Acinetobacter* sp. LBBMA LU3 increased linearly with the temperature, and was not affected by salinity (up to 150 g L⁻¹) or pH (3-8). It was observed the existence of interaction between pelleted cells and floating cells in the same culture of some strains, which determines the de-emulsification activity of the culture. This is the first report of this type of interaction between different cells of the same bacterial culture, in relation to its W/O emulsion breaking activity. Also, the negative effect of floating cells of some bacterial strains on the separation of the oil phase present in W/O emulsion represents new knowledge to the area. The de-emulsification activity of *Acinetobacter* sp. LBBMA LU3 was not affected by autoclaving or by freezing/thawing of the cell suspension, which demonstrates that cell integrity is not required for de-emulsification activity. The use of cells of the same bacterial strain with different values of cell surface hydrophobicity, obtained during cultivation in nitrogen-limited medium, revealed that there is not a unique relationship between cell surface hydrophobicity and the ability to break W/O emulsion. Cell surface hydrophobicity correlates both positively and negatively with the W/O emulsion breaking activity and with the ability to separate kerosene present in the emulsion. It is concluded that other bacterial cell surface characteristics, and not its hydrophobicity, are relevant for the de-emulsification activity.

INTRODUÇÃO

Durante sua extração, o petróleo comumente vem associado à água de produção que, em muitos campos produtores, tem volume maior que o do próprio petróleo. Essa água de produção passa por diversas etapas de tratamento, que têm por objetivo recuperar parte do óleo e adequar a água para sua reutilização ou para o descarte. A água de produção encontra-se presente em duas formas, a livre e a emulsificada. A emulsificação entre o óleo e a água de produção resulta em uma mistura de fases estável, caracterizada pela formação de gotículas muito pequenas, as quais ocorrem em vários estágios da produção de petróleo. A emulsificação é resultante do próprio processo de extração do óleo e do cisalhamento das fases em bombas, válvulas e outros equipamentos.

A água de produção é comumente salina e contém sólidos suspensos, tais como areia, lodo, argila, outros silicatos e gipsita. Essa água pode ser proveniente da própria formação produtora ou de processos de recuperação secundária. No interior do reservatório, o óleo e a água encontram-se geralmente em duas fases separadas. Ao escoarem através das tubulações de produção, essas fases são submetidas à agitação e cisalhamento, promovendo a dispersão de uma fase na outra, dando origem a diminutas gotas. Os sólidos presentes são liberados pela erosão de rochas ou pela interação da água injetada com a formação rochosa.

A presença da água no petróleo é indesejável porque acarreta em maiores custos de transporte, superdimensionamento de tubulações, bombas, tanques, maiores gastos de energia com transporte e armazenamento, problemas no refino, corrosão e incrustação nos equipamentos de produção e transporte (Forero, 2008).

A especificação básica do BSW (Basic Sediment and Water - sedimento e água contidos no óleo) é de 0,5 a 2,0 %, ou seja, o máximo desejável para

transporte através de tubulações (Lee, 1999). O BSW exigido nas operações de refino encontra-se normalmente abaixo de 1 % (Petrobras, comunicação pessoal). Nesse sentido, a eficaz separação entre o óleo e a água de produção é uma das prioridades nas linhas de produção de petróleo. A maior dificuldade nessa operação decorre da formação das emulsões, as quais podem, ainda, contribuir para a formação de incrustações ou com a corrosão de tanques, dutos e tubulações. Quando o óleo encontra-se emulsificado e com BSW acima do padrão aceitável, a adoção de processos de desemulsificação é uma exigência. O processo de desemulsificação é também fundamental para a recuperação do óleo dessa emulsão.

Métodos convencionais de desemulsificação incluem a centrifugação, tratamentos térmicos, tratamento elétrico e processos químicos envolvendo o uso de sabões, ácidos graxos e álcoois de cadeia longa (Grace, 1992; Mohammed et al., 1994; Manning and Thompson, 1995). Entretanto, processos físico-químicos de desemulsificação são de custo elevado e as emulsões têm que ser freqüentemente transportadas para uma central, onde o processo de desemulsificação ocorrerá. Uma alternativa de desemulsificação são os métodos baseados na utilização de micro-organismos ou produtos do seu metabolismo para desestabilizar as emulsões e favorecer a separação das fases água e óleo. A ação desemulsificante dos micro-organismos está relacionada a características de superfície celular, especialmente sua hidrofobicidade, ou à produção de compostos com ação de superfície – biossurfactantes (Kosaric, 1992).

Neste trabalho, foram selecionadas culturas bacterianas com capacidade desemulsificante, visando à sua aplicação no tratamento de emulsões dos tipos W/O e O/W. A relação entre a hidrofobicidade celular e a atividade desemulsificante, assim como a influência do pH, da temperatura e da salinidade sobre a eficiência de desemulsificação, foram também objeto do estudo.

REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é o país com a maior matriz energética renovável do mundo industrializado, embora os combustíveis fósseis, em especial o petróleo e o gás natural, contribuam ainda com 53,6 % desta matriz (<http://www.cop15brasil.gov.br/pt-BR/?page=panorama/matriz-energetica-limpa>, acessada em 08/02/2010). Somente o petróleo representa 68,5 % da energia produzida a partir dos combustíveis fósseis, sendo ainda amplamente utilizado como matéria-prima em atividades industriais de produção de plásticos, de fertilizantes nitrogenados, de solventes, de parafinas, de óleos lubrificantes, entre outros produtos (<http://www.petrobras.com.br/pt/produtos/>, acessado em 08/02/2010).

O petróleo (do latim *petra* = pedra e *oleum* = óleo) é derivado de plantas e animais aquáticos que viveram e morreram há centenas de milhões de anos atrás. As substâncias orgânicas desses organismos se misturaram com lama e areia em depósitos em camadas que, ao longo de milênios, foram geologicamente transformadas em rocha sedimentar. Gradualmente, a matéria orgânica sofreu decomposição e, eventualmente, foi transformada em petróleo (ou um precursor relacionado), que migrou das camadas de formação original para rochas mais porosas e permeáveis, tais como arenito e siltito, onde finalmente tornou-se aprisionado. Tais depósitos de petróleo aprisionado são chamados de reservatórios. Uma série de reservatórios dentro de uma estrutura rochosa comum ou uma série de reservatórios em formações distintas, mas vizinhas, constitui o que se denomina de campo de petróleo (Dijkers, 1985; Planckaert, 2005; Speight, 2007).

Os principais componentes do petróleo são hidrocarbonetos, compostos que mostram variação em sua estrutura molecular. Os mais simples compõem um grupo de moléculas em forma de cadeias abertas, conhecidas como as parafinas. Essa ampla série de moléculas se estende a partir do metano, que constitui o gás natural, e de líquidos que são refinados e originam os

combustíveis, como gasolina e diesel, até compostos sólidos, como ceras cristalinas. Já os naftenos, que compõem um grupo de moléculas em forma de anel, variam desde líquidos voláteis, tais como a nafta, até substâncias de alto peso molecular, isoladas como a fração asfáltica. Outro grupo de hidrocarbonetos em forma de anel inclui os compostos aromáticos, sendo o benzeno o principal composto nessa série (Dikkers,1985; Planckaert, 2005 e Speight, 2007). Alguns constituintes são os remanescentes da matéria orgânica original e, como tais, são utilizados pelos geoquímicos para se reconstituir a evolução do fluido e para ligá-lo à sua rocha de origem. Nesse grupo, incluem-se as porfirinas, os isoprenóides, os esteranos e os hopanos. Esses últimos são comumente usados para se medir o nível de biodegradação do óleo (Planckaert, 2005). Constituintes não-hidrocarbônicos do petróleo incluem derivados orgânicos de nitrogênio, oxigênio, enxofre e os metais níquel e vanádio (Dikkers,1985; Planckaert, 2005; Speight, 2007).

Um reservatório de petróleo é constituído de três elementos principais, a saber: rocha de origem, rocha de cobertura e rocha reservatório (Dikkers,1985; Planckaert, 2005; Speight, 2007). Além disso, está envolvido na formação dos reservatórios o mecanismo de trapeamento, o qual está associado à ocorrência de movimentos tectônicos. A rocha de origem é a denominação dada aquela na qual o petróleo é formado e de onde ele mais tarde será expulso. A rocha reservatório é porosa e pode armazenar fluidos hidrocarbônicos.

A quantidade total de óleo aprisionado em um reservatório de petróleo, conhecida como “original oil in place”, depende tanto da porosidade da rocha quanto da saturação. A saturação de um fluido corresponde à razão entre o volume do fluido por unidade de volume poroso, expresso em porcentagem. A saturação de óleo não atinge 100 %, em razão da presença de água aprisionada juntamente com o óleo na rocha-reservatório. A função da rocha de cobertura é interromper a migração dos hidrocarbonetos e permitir a formação do reservatório de petróleo. Os hidrocarbonetos, tanto no estado líquido quanto gasoso, são menos densos do que a água e tendem a migrar para as camadas superiores do reservatório, de modo que apenas rochas impermeáveis podem interromper esse movimento vertical. As rochas de cobertura geralmente possuem um comportamento plástico, caracterizado por sua capacidade de

sofrer deformação sem se romper e são rochas com baixa porosidade e permeabilidade.

A formação de reservatórios de petróleo está condicionada à ocorrência de três eventos, a saber: a sedimentação da matéria orgânica, juntamente com os minerais que irão compor a rocha de origem; a transformação da matéria orgânica, diagênese e catagênese e as deformações tectônicas, que propiciarão o aprisionamento dos hidrocarbonetos ao darem origem à rocha selante ou de cobertura.

Em formações subterrâneas naturalmente existem algumas rochas que são permeáveis a fluidos como água, óleo ou gás, e muitas delas foram primeiramente saturadas com água (Amyx (1960), citado por Veil et al. 2004). Nesses reservatórios, os hidrocarbonetos menos densos migram para locais sem escape, deslocando as chamadas águas de formação. Desse modo, um reservatório geralmente contém hidrocarbonetos e água. Fontes dessa água podem incluir fluxos oriundos de camadas localizadas acima ou abaixo da zona de hidrocarbonetos, da própria zona de hidrocarbonetos ou fluidos e de aditivos injetados durante as atividades de exploração. A água originalmente presente no reservatório é freqüentemente denominada de *água conata* ou *água de formação* e quando o reservatório entra em produção e os fluidos presentes são trazidos à superfície recebe a denominação de *água produzida* (Veil et al., 2004). Assim, a água de produção inclui qualquer água contida no reservatório e que seja trazida à superfície juntamente com o óleo ou gás produzidos.

Quando os hidrocarbonetos são retirados de um reservatório eles chegam à superfície como uma mistura líquida cuja composição é dependente da constituição do óleo bruto ou gás natural que estão sendo produzidos. Geralmente, inclui uma mistura de hidrocarbonetos líquidos ou gasosos, água de produção, sólidos dissolvidos ou em suspensão, sólidos produzidos - areia e silte - e fluidos e aditivos que podem ter sido adicionados ao reservatório durante as atividades de exploração e de produção (Dijkers, 1985; Veil et al., 2004; Planckaert, 2005; Speight, 2007).

Os componentes orgânicos e inorgânicos da água produzida podem estar em solução, suspensão, emulsão ou ainda como partículas adsorvidas e material particulado (Tibbetts et al., 1992). Além de seus componentes naturais as águas de produção podem conter águas subterrâneas ou do mar, injetadas

para manter a pressão do reservatório, bem como diversos sólidos e bactérias. A maioria das águas produzidas é mais salina do que a água do mar (Cline, 1998, citado por Clark e Veil, 2009). Elas também podem incluir aditivos químicos usados nas operações de perfuração, de produção e nos processos de separação entre o óleo e a água.

As propriedades físicas e químicas da água de produção dependem da localização geográfica do reservatório, da formação geológica com que a água de produção ficou em contato durante milhares de anos, do tipo de hidrocarboneto que será explorado e das técnicas de exploração empregadas (Veil et al., 2004).

Petróleo e água são imiscíveis em condições normais, o que facilita sua separação. Porém, em decorrência das condições existentes durante a formação e migração do petróleo e do longo tempo de confinamento, parcelas de hidrocarbonetos podem se solubilizar na água. Além disso, durante as diversas operações de produção de petróleo são formadas emulsões, caracterizadas como gotas diminutas de um líquido dispersas em outro, com o qual seja imiscível. A ocorrência de emulsificação é indesejável, por dificultar as etapas posteriores de separação entre o óleo cru e a água de produção. A capacidade de “quebra” dessas emulsões depende das características do óleo, da água e dos seus percentuais na mistura (Fernandes Junior, 2006).

Ao ser iniciado o processo de separação óleo/água a parte da água denominada de água livre separa-se rapidamente. Se houvesse tempo para decantação, as emulsões poderiam romper-se naturalmente. Porém, em uma emulsão, os glóbulos de uma fase geralmente são rodeados por uma fina película de um agente emulsificante, a qual os impede de se agrupar e formar gotículas maiores. O filme emulsificante pode ser quebrado mecanicamente, eletricamente ou pelo uso de agentes desemulsificantes, de tal modo que a proporção de água no óleo seja reduzida para os valores especificados (Speight, 2007).

A emulsificação água/óleo se constitui em problema para as diversas etapas da cadeia produtiva do petróleo, desde sua exploração até o refino. Essas emulsões podem ser classificadas como “tight” (microemulsões, caracterizadas por gotas muito pequenas, de aproximadamente 10^{-2} μm , difíceis de quebrar) ou “loose” (formadas por gotículas maiores, de

aproximadamente 5 μm , instáveis e fáceis de serem quebradas) (Larson, 1994). A presença de água e de frações sólidas no óleo pode contribuir para a ocorrência de corrosão e de incrustação, de tubulações e reatores. O máximo de sedimento e água (BSW) aceito para bombeamento é de 0,5 a 2 % (Van Hamme, 2003), e nas operações de refino o valor abaixo de 1 % é o geralmente requerido.

A estabilidade das emulsões é influenciada por fatores como viscosidade, tamanho das gotas dispersas, razão de volume entre as fases envolvidas, temperatura, pH, idade da emulsão, tipo de agentes emulsificantes presentes, diferença de densidade entre os fluidos envolvidos e agitação (Singh, 2006). Desse modo, a separação da água emulsificada no óleo, com vistas ao atendimento do padrão de BSW exigido, requer a adoção de métodos de desemulsificação que possam ser eficientes em diferentes condições de operação.

Métodos tradicionais de desemulsificação incluem a centrifugação, tratamentos térmicos, tratamento elétrico e químico envolvendo o uso de sabão, de ácidos graxos e de álcoois de cadeia longa (Grace, 1992; Mohammed et al., 1994; Manning e Thompson, 1995).

Existem equipamentos capazes de tratar adequadamente emulsões contendo gotículas maiores do que 100 μm ou menores que 20 μm . Maior dificuldade ocorre quando a emulsão é caracterizada pela presença de gotículas com diâmetro médio, entre 20 e 100 μm , pois os equipamentos necessários ocupam grande área superficial e apresentam elevado custo. Independentemente da tecnologia empregada, processos físicos e químicos para desemulsificação são extremamente onerosos e nem sempre propiciam a obtenção de valores de BSW requeridos nas operações de transporte e refino (Van Hamme, 2003).

Diversas espécies microbianas, incluindo *Nocardia amarae* (Cairns, 1982), *Corynebacterium petrophilum* (Stewart, 1983, citado por Van Hamme, 2003), *Rhodococcus auranticus* (Ramsay, 1983, citado por Van Hamme, 2003), *Bacillus subtilis* (Janiyani, 1994), *Micrococcus* spp. (Das, 2001), *Torulopsis bombicola* (Duvnjak, 1987) e culturas bacterianas mistas (Ward e Singh, 1998; Nadarajah et al., 2001; 2002) possuem capacidade desemulsificante. A desemulsificação de emulsões do tipo água em óleo (W/O) requer superfície

celular hidrofílica, o que é uma característica de células em crescimento exponencial ou no início da fase estacionária. Por outro lado, a desemulsificação de emulsões do tipo O/W requer superfície hidrofóbica, a qual é característica de células em fase de metabolismo endógeno, e está relacionada com a acilação e deposição de exopolissacarídeos na superfície externa, ácidos carboxílicos não-covalentemente ligados ou biossurfactantes que são liberados por excreção ou lise celular (Kosaric, 1992).

Nocardia amarae e alguns consórcios bacterianos possuem ação desemulsificante O/A associada à hidrofobicidade da superfície celular (Van Hamme, 2003). Uma grande variedade de componentes da parede celular pode contribuir para a hidrofobicidade da superfície celular, a exemplo dos cetal-o-acetilados e cetal-piruvato de polissacarídeos ou glicoproteínas globulares, no glicocálice; dos lipolissacarídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e proteínas hidrofóbicas da membrana externa de bactérias gram-negativas; do ácido lipoteicoico da parede celular de bactérias gram-positivas e das extremidades acetiladas de polissacarídeos, como micoloil-arabinogalactanas de *Mycobacteria*, *Nocardia* e *Corynebacteria* (Kosaric, 1992).

Além da ação direta das células microbianas na desestabilização das emulsões, alguns micro-organismos exercem atividade desemulsificante por meio da excreção de biossurfactantes (Nadarajah, 2002). Surfactantes são moléculas anfifílicas, caracterizadas por possuírem uma região de afinidade com a água e uma região com afinidade por compostos hidrofóbicos, ou seja, um domínio hidrofílico e um hidrofóbico. Usualmente, o domínio hidrofóbico é um hidrocarboneto, enquanto que o hidrofílico pode ser não-iônico, iônico (catiônico ou aniônico) ou anfotérico (Christofi et al., 2002). Por serem anfifílicos, são moléculas ativas de superfície, ou seja, ao serem adicionados em sistemas água-óleo ou água-ar, se posicionam na interface, direcionando suas regiões de acordo com as afinidades das mesmas para com os componentes do sistema (Sabatini et al., 2006).

Biossurfactantes são produzidos por diversos micro-organismos e podem apresentar diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície. Geralmente, a estrutura inclui um domínio hidrofílico, composto de aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, mono-, di- ou polissacarídeos; e um domínio

hidrofóbico, composto freqüentemente de ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados (Georgiou *et al.*, 1992).

A produção de biossurfactantes por alguns micro-organismos é uma resposta fisiológica mediada por mecanismos de “quorum sensing”. O papel fisiológico e ecológico de biossurfactantes engloba diferentes processos, dentre os quais podem ser mencionados: (i) o aumento na biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos (Bicca *et al.*, 1999; Bognolo, 1999; Calvo *et al.*, 2004); (ii) a ligação com metais pesados, com conseqüente redução de sua toxicidade (Herman *et al.*, 1997; Mulligan *et al.*, 1999; Sandrin *et al.*, 2000); (iii) atividade antimicrobiana; (iv) aumento da patogenicidade e (v) fixação ou desprendimento de substratos e superfícies (Desai e Banat, 1997).

A capacidade de algumas espécies microbianas produzirem biossurfactantes, promovendo com isso a formação de emulsão entre a água e o petróleo, e a atividade desemulsificante de alguns bioemulsificantes, tais como ramnolípídeos, são fenômenos aparentemente paradoxais. A atividade de desemulsificação tem geralmente sido observada em emulsões W/O, sendo que processos de bioemulsificação microbiana ocorrem durante a biodegradação microbiana do óleo em emulsões do tipo óleo em água (Van Hamme, 2003). Esses dois tipos de emulsão exibem estado físico bem diverso, como demonstrado pelo fato de que surfactantes sintéticos que estabilizam emulsões O/W não são efetivos em estabilizar emulsões água em óleo e vice-versa. Surfactantes efetivos em estabilizar emulsões óleo em água e água em óleo possuem diferentes balanços hidrofílico-lipofílico (Van Hamme, 2003).

O fenômeno da emulsificação em uma fase aquosa contínua (O/W) é resultante de um processo de intenso crescimento microbiano aeróbio. Em contraste, em uma fase oleosa contínua (W/O), a limitada transferência de oxigênio para as células microbianas concentradas nas gotículas aquosas irá limitar o crescimento microbiano. Qualquer efeito de desemulsificação será provavelmente devido à ação das células em estágio estacionário (de não-crescimento) que foram adicionadas como inóculo (Nadarajah, 2002).

As características avaliadas durante a seleção de micro-organismos potencialmente aplicáveis em operações de desemulsificação incluem a hidrofobicidade da superfície celular, a produção de agentes desemulsificantes, especialmente biossurfactantes, a tolerância do micro-organismo a condições

extremas de temperatura, de salinidade, de pH, à presença de hidrocarbonetos e à escassez nutricional, a manutenção da atividade desemulsificante após a morte celular, dentre outras (Kosaric, 2002). Dentre essas características, a hidrofobicidade celular e a produção de biossurfactantes com ação desemulsificante são consideradas como as que mais interferem na capacidade desemulsificante dos micro-organismos. Contudo, não foram encontrados, na literatura consultada, trabalhos que descrevessem uma avaliação sistemática da influência dessas características sobre a atividade desemulsificante dos micro-organismos.

No presente estudo, a hipótese de trabalho foi a de que a capacidade de quebra de emulsões água em óleo ou óleo em água de isolados bacterianos está relacionada à hidrofobicidade celular e à produção de biossurfactantes com ação desemulsificante.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Culturas microbianas e condições de cultivo

Para isolamento de bactérias com potencial para quebra de emulsões, utilizou-se composto de resíduo sólido urbano contaminado artificialmente com óleo diesel. Uma porção desse material (5 g), utilizado em estudos prévios de biorremediação, foi incubado em 50 mL de meio mineral MMSM (Huang *et al.*, 2009) acrescido de 4 % de parafina líquida (Fluka Analytical - 76235), a 200 rpm e 35 °C, durante 48 horas. Após duas repicagens para o mesmo meio de cultura, a cultura mista resultante foi avaliada quanto à atividade desemulsificante. Constatado resultado positivo para a quebra de emulsão, a cultura foi diluída serialmente em solução salina e plaqueada em TSA. Após incubação a 35 °C por até quatro dias, selecionaram-se 23 colônias, abrangendo todos os morfotipos encontrados, para obtenção dos isolados a serem empregados no estudo. As linhagens de interesse foram identificadas com base no perfil de ácidos graxos, empregando-se o sistema Sherlock® (Midi) com a biblioteca ITSA1 “Instant Environmental TSA library (30°C)” versão 1.0. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos com o Instant Fame Kit™, de acordo com as recomendações do fabricante. Os perfis de ácidos graxos foram submetidos à análise de agrupamento, utilizando-se a ferramenta disponível no sistema Sherlock®, para descartar isolados de uma mesma linhagem, mantendo-se somente um isolado representante de cada linhagem na coleção de culturas. Para avaliação da capacidade desemulsificante, as culturas foram cultivadas em meio MMSM (Huang, 2009) contendo parafina como única fonte de carbono, a 35 °C e 200 rpm. As avaliações foram feitas após 22 e 168 horas do início do cultivo. Os ensaios de quebra de emulsão foram feitos usando-se suspensões celulares com densidade óptica (DO₆₀₀) ajustada em cerca de 1,2. Avaliou-se também a capacidade desemulsificante de suspensões de células não-sedimentáveis,

obtidas após centrifugação das culturas bacterianas a 8.500 g por 20 minutos, e de extratos livres de células, obtidos após a filtração das suspensões de células não-sedimentáveis através de membranas de 0,22 µm.

2. Preparo das emulsões e avaliação da atividade desemulsificante

Para o preparo das emulsões água em óleo e óleo em água, foi utilizado o modelo descrito por Das (2001), com modificações. A emulsão água em óleo (W/O) foi obtida pela mistura de 4,5 mL de água destilada com 4,5 mL de querosene, contendo 16,7 g L⁻¹ do surfactante Span®80. A mistura foi colocada em tubos de vidro de 20 mL com tampa de rosca e agitada a 3000 rpm em agitador Fisher - Digital Vortex Mixer de Luxe - por 1 min, na presença de 1 mL das culturas bacterianas, das suspensões de células não-sedimentáveis e dos respectivos extratos livres de células. Os controles foram feitos substituindo-se as culturas bacterianas por meio de cultura não-inoculado ou por PBS (pH = 7,4), nos ensaios em que as células foram lavadas e ressuspensas nessa solução. A emulsão óleo em água (O/W) foi preparada misturando-se 4,5 mL de água destilada, contendo 14 g L⁻¹ do surfactante Tween®60, com 4,5 mL de querosene contendo 6 g L⁻¹ do surfactante Span®60. A mistura foi agitada a 3.000 rpm por 1 min. A capacidade de desemulsificação das culturas microbianas foi avaliada após um período de repouso de 24 horas a 35 °C, com base nas variações de volume da fase oleosa (no topo), da fase aquosa (no fundo) e da emulsão (no meio). A capacidade de desemulsificação foi avaliada pela razão de quebra de emulsão (RQE):

$$\text{RQE (\%)} = 1 - (\text{Volume restante de emulsão} / \text{Volume original de emulsão} + \text{Volume da cultura adicionada}) \times 100$$

A capacidade de separação de querosene (CSQ) foi avaliada pela fórmula:

$$\text{CSQ (\%)} = (\text{Volume querosene separado} / \text{Volume querosene adicionado}) \times 100$$

Todos os ensaios, nessa etapa e nas etapas seguintes, foram conduzidos com três repetições.

3. Estabilidade da capacidade desemulsificante

A manutenção da capacidade de desemulsificação de uma das culturas bacterianas foi avaliada após a suspensão de células totais (22 horas de crescimento em MMSM, 35 °C, 200 rpm) ser submetida à autoclavagem (121° C por 20 min.) ou ao congelamento a -20° C por 24 horas, seguido de descongelamento à temperatura ambiente.

4. Efeito da acidez, da salinidade e da temperatura sobre a atividade desemulsificante

Uma das culturas bacterianas, definida em etapa anterior como eficiente em quebrar emulsão W/O, foi utilizada para se avaliar o efeito do pH, da salinidade e da temperatura sobre a atividade desemulsificante.

Para o estudo do efeito da acidez, foi utilizado tampão fosfato com valores de pH ajustado para valores de 3, 4, 5, 7 ou 8, em substituição a fase aquosa utilizada para obtenção das emulsões.

O efeito da salinidade foi avaliado adicionando-se NaCl à água, em concentração de 0, 30, 60, 90, 120 ou 150 gL⁻¹. Neste ensaio e no anterior, as misturas foram incubadas em repouso a 35 °C, durante 24 horas.

A influência da temperatura sobre a atividade desemulsificante da linhagem em estudo foi determinada após incubação das misturas de suspensões celulares com emulsões W/O na faixa de 30 °C a 60 °C.

5. Avaliação da hidrofobicidade celular

A hidrofobicidade da superfície celular foi avaliada pelo método de adsorção a hidrocarbonetos (MATH) (Sanin et al., 2003, com modificações). A suspensão de células foi centrifugada a 8.500 g por 10 minutos, lavada em solução salina e ressuspenida em PBS (pH 7,4), para se obter uma DO₄₄₀ inicial de aproximadamente 1,2. Um volume de 3 mL da suspensão de células foi adicionado ao tubo de ensaio e então recoberto com 0,3 mL de hexadecano. Os tubos foram mantidos em repouso a 30 °C e em seguida agitados em agitador de tubo a 3.000 rpm por 2 min. A mistura foi deixada em

repouso por 15 min, após o que foram feitas avaliações da DO₄₄₀ (final) da fase inferior.

A capacidade de adsorção a hidrocarbonetos (MATH) foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{MATH} = [1 - \text{DO}_{440} (\text{final}) / \text{DO}_{440} (\text{inicial})] \times 100$$

6. Relação entre hidrofobicidade celular e capacidade de quebra de emulsões

Duas das linhagens bacterianas, que se mostraram eficientes em quebrar emulsões, foram utilizadas para se estudar a relação entre a hidrofobicidade celular e a capacidade de quebra de emulsões. Adicionalmente, foi utilizada a *Sphingomonas capsulata* LBBMA 18T, empregada em estudos sobre adesão celular a partículas de solos (Borges et al., 2008).

As linhagens foram submetidas a um processo de desnutrição em meio mineral (MMSM) com carência de nitrogênio, como forma de se obterem suspensões celulares de uma mesma linhagem com diferentes valores de hidrofobicidade. Os micro-organismos foram cultivados em caldo TSB, a 35 °C e 200 rpm, por 6,5 horas (LBBMA LU 1) ou por 5 horas (LBBMA LU 7a e LBBMA 18T). Adicionalmente, a *Sphingomonas capsulata* LBBMA 18T foi também cultivada em caldo R2A por 5 horas. As culturas foram então centrifugadas a 8.500 g e ressuspensas em meio mineral sem nitrogênio (g L⁻¹): K₂HPO₄, 4,0; KH₂PO₄, 6,0; MgSO₄.7H₂O, 0,2; extrato de levedura, 0,01; glicose, 20,0 e solução mineral, 1mL L⁻¹ (1L: 1g de CaCl₂.2H₂O, 1g de FeSO₄.7H₂O e 1,4g de EDTA), seguindo-se incubação a 35 °C e 200 rpm. Para obtenção de células com valor de hidrofobicidade mais elevado, o LBBMA LU 1 foi também cultivada em caldo TSB por 24 e 48 horas. A hidrofobicidade celular foi medida pelo método MATH no tempo zero e em intervalos de 24 horas durante a desnutrição, por até 168 horas. Em cada avaliação, as suspensões celulares foram centrifugadas e ressuspensas em PBS. A capacidade desemulsificante foi avaliada e os dados submetidos à análise de correlação de Pearson, para se verificar a relação entre hidrofobicidade celular e capacidade desemulsificante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Obtenção de linhagens bacterianas e avaliação da atividade desemulsificante

A cultura mista, obtida a partir da inoculação de composto de resíduo sólido urbano artificialmente contaminado com óleo diesel em meio MMSM-parafina, foi capaz de quebrar os dois tipos de emulsão. A razão de quebra da emulsão (RQE) W/O foi de 22 % enquanto a da O/W correspondeu a 70 %. Nos dois tipos de emulsão a cultura mista propiciou a separação de cerca de 50 % do querosene contido nas duas emulsões, e a remoção de aproximadamente 89 % da água contida na emulsão O/W. Não houve separação de água na emulsão W/O.

O plaqueamento da cultura mista em R2A resultou na obtenção de 23 isolados. O agrupamento dos perfis de ácidos graxos desses isolados revelou a existência de 12 linhagens distintas. Os isolados LBBMA LU 2, LBBMA LU 5a, LBBMA LU 6a, LBBMA LU 8, LBBMA LU 9 e LBBMA LU 11 agruparam-se com o isolado LBBMA LU 1 (distância Euclidiana menor que 2,5). Esse isolado foi mantido na coleção e os demais foram descartados. Usando-se o mesmo critério, os isolados LBBMA LU 13, LBBMA LU 14a e LBBMA LU 15a agruparam-se com o LBBMA LU 10; o isolado LBBMA LU 14b agrupou-se com o LBBMA LU 5b e o isolado LBBMA LU 13b com o LBBMA LU 6b (Figura 1).

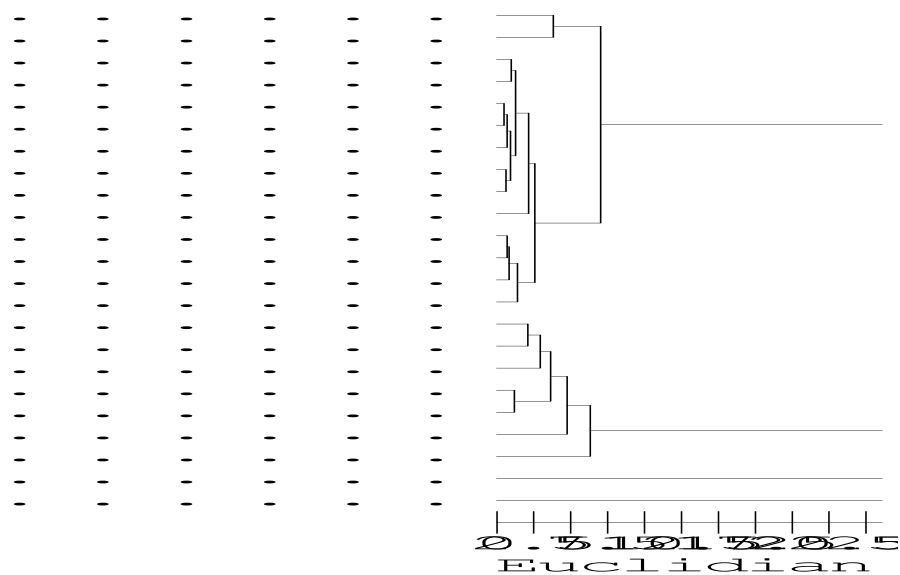


Figura 1: Análise de agrupamento dos perfis de ácidos graxos de isolados bacterianos, obtidos após inoculação de resíduo de lixo urbano contaminado artificialmente com óleo diesel em meio mineral contendo parafina como única fonte de carbono. Os perfis de ácidos graxos foram obtidos após cultivo dos isolados em ágar R2A a 30 °C por 24 horas. Os isolados agrupados com distância Euclidiana menor que 2,5 foram considerados como sendo de uma mesma linhagem. Os isolados LBBMA (LU1, LU3, LU4, LU5b, LU7a, LU7b, LU10, LU12, LU14c, LU15b e LU16) foram os selecionados para serem mantidos na coleção e utilizados nos estudos de desemulsificação.

A identidade das 12 linhagens mantidas na coleção, juntamente com os resultados dos ensaios de desemulsificação com as mesmas, são apresentados na Tabela 1. Nenhuma das linhagens mostrou atividade de quebra de emulsão do tipo óleo em água (O/W) nas condições avaliadas. Os dados apresentados no trabalho referem-se, portanto, somente aos resultados obtidos com a emulsão água em óleo (W/O).

Tabela 1 – Atividade desemulsificante (emulsão água em óleo – W/O) de linhagens bacterianas obtidas a partir da inoculação de resíduo sólido urbano artificialmente contaminado com óleo diesel em meio mineral contendo parafina como fonte de carbono

Isolado*	Suspensão celular				Suspensão de células não-sedimentáveis				Extrato livre de células			
	22 horas		168 horas		22 horas		168 horas		22 horas		168 horas	
	RQE	CSQ	RQE	CSQ	RQE	CSQ	RQE	CSQ	RQE	CSQ	RQE	CSQ
LBBMA												
LU 1	43 (21)	75 (9)	35 (0)	80 (0)	51 (21)	82 (14)	30 (0)	70 (0)	15 (9)	17 (15)	33 (3)	85 (6)
LU 3	87 (2)	98 (0)	33 (0)	75 (0)	83 (0)	100 (6)	43 (21)	75 (9)	17 (9)	11 (19)	28 (3)	70 (9)
LU 4	64 (23)	72 (25)	44 (21)	77 (8)	84 (5)	100 (8)	64 (5)	83 (3)	8 (3)	20 (6)	36 (22)	50 (19)
LU 5b	75(3)	85 (0)	33 (0)	75 (0)	64 (6)	92 (3)	51 (18)	78 (8)	20 (11)	22 (39)	36 (24)	72 (29)
LU 7a	74 (4)	87 (3)	33 (0)	75 (0)	44 (24)	75 (9)	30 (0)	70 (0)	22 (6)	0 (0)	28 (1)	70 (3)
LU 7b	69 (8)	83 (11)	34 (2)	78 (4)	47 (29)	68 (11)	30 (0)	70 (0)	-	-	-	-
LU 10	44 (23)	75 (9)	33 (0)	75 (0)	75 (1)	85 (5)	54 (21)	82 (10)	2 (4)	6 (10)	30 (1)	76 (3)
LU 12	39 (24)	37 (18)	16 (6)	37 (14)	37 (29)	18 (24)	14 (13)	33 (29)	-	-	-	-
LU 14c	17 (0)	40 (0)	30 (0)	70 (0)	30 (0)	70 (0)	30 (0)	70 (0)	-	-	-	-
LU 15b	54 (9)	43 (6)	28 (0)	65 (0)	33 (5)	63 (12)	28 (0)	65 (0)	-	-	-	-
LU 16	28 (2)	65 (5)	41 (36)	65 (33)	26 (8)	50 (35)	30 (12)	55 (10)	-	-	-	-
Branco	13 (2)	30 (5)	13 (2)	30 (5)	13 (2)	30 (5)	13 (2)	30 (5)	4 (6)	9 (16)	4 (6)	9 (16)
d.m.s	44,7	30,8	ns	31,5	43,1	40,9	33,5	29,5	ns	ns	ns	42,5

Os micro-organismos foram cultivados em meio MMSM contendo parafina líquida como fonte de carbono, a 35 °C e 200 rpm, durante 22 horas ou 168 horas. Utilizou-se 1 mL da suspensão celular (D.O_{600nm} ajustado em cerca de 1,2) no ensaio de desemulsificação, juntamente com 9 mL de emulsão água em óleo. Querosene foi a fase contínua. A mistura foi agitada a 3.000 rpm e mantida a 35 °C por 24 horas. RQE (%) = razão de quebra de emulsão; CSQ (%) = capacidade de separação de querosene da emulsão. Os dados representam a média de três repetições. Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média.

*Isolados LBBMA (LU1, LU3, LU4, LU7a, LU10) = *Acinetobacter* sp.; LBBMA (LU5b e LU7b) = *Pseudomonas mendocina*; LBBMA LU12 = *Arthrobacter nicotianae*; LBBMA LU 14c = *Pseudomonas* sp.; LBBMA LU15b = *Xanthomonas* sp.; LBBMA LU16 = *Pseudomonas stutzeri*.

Das doze linhagens bacterianas avaliadas, seis apresentaram capacidade de quebra de emulsão acima de 50 % após 22 horas de cultivo em meio MMSM-parafina. Essas linhagens foram consideradas potencialmente desemulsificantes. Dentre estas, quatro apresentaram capacidade de desemulsificação próxima ou acima de 70 %. Essas linhagens (*Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, *Pseudomonas mendocina* LBBMA LU 5b, *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 7a e *P. mendocina* LBBMA LU 7b) foram consideradas eficientes para quebra de emulsão água em óleo. A adição de suspensões celulares de sete linhagens com 22 horas de crescimento à emulsão W/O propiciou elevada separação de querosene (acima de 70 %). Destacou-se, nessa característica, a *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, com a qual se obtiveram 98 % de separação de querosene, após 24 horas de contato com a emulsão (Tabela 1). Essa linhagem destacou-se entre as demais do mesmo gênero, em termos de eficiência de quebra de emulsão e de separação de querosene (Tabela 1). A atividade desemulsificante de isolados pertencentes a esse gênero já fora reportada por Nadarajah (2002).

A manutenção das culturas em crescimento por um período de 168 horas resultou na redução da sua capacidade de quebra de emulsão W/O, comparativamente aos valores obtidos com culturas mais novas (22 horas, Tabela 1). Esse efeito foi atribuído a um possível aumento de hidrofobicidade das células. A hidrofobicidade celular geralmente aumenta em culturas bacterianas após a entrada na fase estacionária (Kosaric, 1987), e células menos hidrofóbicas são mais eficientes em quebrar emulsões do tipo W/O (Kosaric, 1992). A título de exemplo, a avaliação da hidrofobicidade da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1, cultivada em caldo TSB (item 4), revelou um aumento de 46 %, após 6 horas de cultivo, para 74 %, após 24 horas. Ressalte-se que, com o aumento da idade das culturas, a capacidade de separação de querosene (CSQ) não foi reduzida de forma tão expressiva como a capacidade de quebra de emulsão (RQE) (Tabela 1). A linhagem *Pseudomonas* sp. LBBMA LU 14c apresentou um comportamento diferente das demais, aumentando tanto a RQE quanto a CSQ com o aumento da idade da cultura.

Comparando-se os resultados obtidos com as suspensões celulares com os extratos livres de células, é possível concluir que a presença de células é

essencial tanto para a quebra de emulsão quanto para a separação de querosene, ao se utilizar culturas jovens, com 22 horas de cultivo em meio MMSM. Considerando-se o fato dos resultados com os extratos livres de células após 168 horas de cultivo terem sido similares aos obtidos com as respectivas suspensões celulares, tanto para a RQE quanto para a CSQ (Tabela 1), foi atribuída à presença de compostos desemulsificantes nas culturas mais velhas a ação desemulsificante e, em especial, à capacidade de separar a fase oleosa contida nas emulsões.

Os testes da presença de compostos com atividade de superfície, biossurfactantes nas suspensões celulares das seis linhagens mais eficientes em quebrar a emulsão W/O, obtidas nas duas fases de crescimento (22 e 168 horas) indicaram a ausência de compostos com atividade de superfície nessas preparações (Figura 1).



Figura 1 – Avaliação da presença de compostos com atividade de superfície em suspensões celulares de seis linhagens bacterianas com atividade desemulsificante W/O (técnica do colapso da gota, Bodour et al.,1998). As suspensões celulares foram dispensadas (5 μ L) sobre uma camada de óleo lubrificante, previamente espalhado sobre uma tampa de microplaca. Os conjuntos na parte superior e inferior da figura representam as suspensões celulares com 22 e 168 horas de crescimento em meio MMSM-parafina, respectivamente. W = controle negativo (água). +C = controle positivo (surfactina). Cristal violeta foi adicionado ao controle positivo, na parte inferior da figura, para facilitar a visualização do espalhamento de uma solução contendo um composto com atividade de superfície. As três linhas, em ambos os conjuntos, representam as três repetições avaliadas. Resultados da mesma avaliação, nos respectivos extratos livres de células, não diferiram dos apresentados acima.

A constatação da presença de compostos com ação desemulsificante W/O sem atividade de superfície, em extratos livres de células após 168 horas de cultivo (Tabela 1 e Figura 1), é contrastante com a aceitação geral de que biodesemulsificantes são compostos com atividade de superfície, sejam eles excretados no meio de crescimento ou aderidos à superfície celular (Huang et al., 2009; 2010; Liu et al, 2009). Conclui-se, portanto, que compostos com atividade desemulsificante e capazes de separar querosene contido em emulsão do tipo W/O não apresentam, necessariamente, atividade de superfície. A natureza desses compostos produzidos pelas linhagens bacterianas estudadas não foi investigada neste trabalho. Por outro lado, a constatação da falta de atividade desemulsificante dessas linhagens em emulsões do tipo O/W é um indício de que a produção de compostos com efeito surfactante é um atributo necessário para a quebra desse tipo de emulsão.

A utilização de suspensões de células não-sedimentáveis nos ensaios de quebra de emulsão W/O apresentou resultados variáveis, quando comparados com os obtidos pelas respectivas suspensões de células totais (Tabela 1). Para algumas das bactérias, após 22 horas de cultivo em meio MMSM-parafina, a remoção das células sedimentáveis por centrifugação resultou em redução da capacidade de quebra de emulsão (*P. mendocina* LBBMA LU 5b, *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 7a, *P. mendocina* LBBMA LU 7b, *Xanthomonas* sp. LBBMA LU 15b); para outras, o efeito foi o oposto (*Acinetobacter* sp. linhagens LBBMA LU 1, LBBMA LU 4 e LBBMA LU 10 e *Pseudomonas* sp. LBBMA LU 14c). A avaliação da concentração de células (UFC mL⁻¹) na suspensão de células totais e na de células não-sedimentáveis de algumas linhagens (*Acinetobacter* sp. LBBMA LU1, LBBMA LU3 e LBBMA LU7a) mostrou haver redução de 1 a 2 ciclos log após a centrifugação. O aumento da ação desemulsificante após a retirada das células difere substancialmente do reportado por outros autores, no que concerne a estreita relação entre concentração de células e atividade desemulsificante (Nadarajah et al.; 2002). Naquele trabalho, os autores reportaram, ainda, que os resultados de desemulsificação obtidos com a suspensão de células totais de uma cultura bacteriana mista foram superiores aos obtidos com a suspensão de células não-sedimentáveis. A argumentação de que a manutenção ou até mesmo o

aumento da atividade desemulsificante possa, neste caso, ser atribuída à presença de compostos desemulsificantes, não é sustentada pelos resultados obtidos com os extratos livres de células dessas culturas, os quais demonstram uma queda significativa da RQE após a retirada das células (Tabela 1).

A capacidade de separação de querosene pelas suspensões de células não-sedimentáveis, comparativamente às obtidas com as suspensões de células totais, não acompanhou, necessariamente, o comportamento exibido para quebra de emulsão pelas culturas com 22 horas de crescimento. Destaca-se, por exemplo, a *P. mendocina* LBBMA LU 5b, cuja RQE foi reduzida de 75 % para 64 %, e cuja CSQ aumentou de 85 % para 92 %. Comportamento similar foi obtido com a *Xanthomonas* sp. LBBMA LU 15b.

A capacidade de quebra de emulsão W/O (RQE) das suspensões de células não-sedimentáveis das linhagens de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, LBBMA LU 4 e LBBMA LU 10 e de *P. mendocina* LBBMA LU 5b, após 168 horas de cultivo em MMSM-parafina, foi maior do que a de suspensões de células totais. O resultado demonstra um efeito benéfico da remoção de células sedimentáveis dessas linhagens por centrifugação, à semelhança do observado com algumas linhagens cultivadas por 22 horas. Contudo, a RQE obtida com os extratos livres de células das linhagens *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, LBBMA LU 4 e LBBMA LU 10 e de *P. mendocina* LBBMA LU 5b, com 168 horas de cultivo, não diferiu da obtida com a suspensão de células totais (Tabela 1). Isso mostra que, numa população de células de uma cultura bacteriana, algumas parecem dar estabilidade às emulsões (células sedimentáveis), enquanto que outras (células não-sedimentáveis) parecem ter o efeito oposto. Esta seria a explicação para o aumento da RQE após a remoção das células sedimentáveis. Os valores similares de RQE entre a suspensão de células totais dessas linhagens e seus respectivos extratos livres de células foram atribuídos a que o efeito de desestabilização das emulsões pelas células não-sedimentáveis é anulado pelo efeito de estabilização das células sedimentáveis. Neste caso, o resultado líquido parece depender somente do efeito de compostos com ação desemulsificante, e indica uma possível interação entre células sedimentáveis e não-sedimentáveis na suspensão de células totais. A mesma observação é válida para as linhagens de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1, LBBMA LU 4 e LBBMA LU 10) e para a

linhagem *Pseudomonas* sp. LBBMA LU 14c com 22 horas de cultivo, exceto pelo fato de não haver, neste caso, presença de compostos com ação desemulsificante. Considerando a literatura consultada, este é o primeiro relato dessas interações entre células distintas em população de uma cultura bacteriana em relação à sua atividade de quebra de emulsão W/O.

A capacidade de separação de querosene da suspensão de células não-sedimentáveis, com 168 horas de crescimento, foi similar ao obtido com as suspensões de células totais. Uma exceção foi *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1, cuja CSQ foi reduzida de 80 % para 70 % após a remoção das células sedimentáveis (Tabela 1). Essa alteração não foi acompanhada de mudança significativa de capacidade de quebra de emulsão. Por outro lado, a remoção completa das células (extrato livre de células) dessa linhagem resultou em uma CSQ similar à obtida com a suspensão de células totais (Tabela 1), ambos maiores do que o obtido com a suspensão de células não-sedimentáveis. Esses resultados evidenciam a existência de um efeito negativo dessas células em termos de capacidade de separação da fase oleosa contida numa emulsão do tipo W/O. O resultado representa contribuição nova ao conhecimento do fenômeno, uma vez que na literatura consultada não há relato similar ao obtido no presente trabalho, ou seja, do efeito negativo das células não-sedimentáveis da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1 sobre a separação da fase oleosa.

2. Estabilidade da capacidade desemulsificante

A autoclavagem da suspensão de células totais da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3 (121 ° C por 20 min.), assim como o congelamento a -20 °C por 24 horas, seguido de descongelamento à temperatura ambiente, aumentaram a atividade de quebra da emulsão W/O e a capacidade de separação de querosene presente na emulsão (Tabela 2). A manutenção ou, neste caso, o aumento da atividade desemulsificante após a autoclavagem da cultura, são desejáveis quando se vislumbra a aplicação industrial de suspensões bacterianas para a quebra de emulsões.

Não houve diferença entre a suspensão celular autoclavada e a submetida ao congelamento/descongelamento. A manutenção da atividade desemulsificante de suspensões celulares após o congelamento/descongelamento já fora descrita por Nadarajah et al. (2002), em trabalho

utilizando uma cultura mista. Contudo, naquele trabalho os autores reportaram uma redução significativa dessa atividade após a autoclavagem, resultado que contrasta com os aqui reportados. Por outro lado, Cairns et al. (1982) não observaram redução da capacidade de desemulsificação de emulsão W/O após a autoclavagem de *Nocardia amarae*. Naquele trabalho, os autores descrevem que a atividade desemulsificante estava relacionada com a superfície das células, e não com compostos excretados no meio de cultura. Isso também é válido para as culturas utilizadas neste estudo, após cultivo por 22 horas em meio MMSM-parafina (Tabela 1). Portanto, a manutenção da atividade desemulsificante da *Acinetobacter* sp.LBBMA LU 3, após a autoclavagem ou o congelamento/descongelamento, demonstra que a integridade das células não é necessária para a atividade desemulsificante, e que esses tratamentos não são suficientes para degradar os componentes de superfície celular responsáveis pela mesma. O aumento demonstrado de atividade desemulsificante ou da capacidade de separação da fase oleosa após a autoclavagem da cultura de *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, descortina oportunidades para inovação na aplicação tecnológica desse conhecimento, que ainda não haviam sido registrados na literatura.

Neste experimento, a RQE da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3 foi de apenas 25,4 % (Tabela 2), e contrasta com os 87 % obtidos no experimento cujos resultados são apresentados na Tabela 1. O mesmo se aplica à CSQ (58,3 x 100 %), a despeito da manutenção de condições experimentais similares, quais sejam, crescimento em meio MMSM-parafina por 22 horas, 35 °C e 200 rpm; DO₆₀₀ das suspensões celulares ajustada em cerca de 1,2; proporção suspensão celular/emulsão de 1/9. Ressalta-se que, no momento da coleta de células para o ensaio de quebra de emulsão, neste experimento, foi observada a formação de uma camada coesa de células na superfície do meio de crescimento (Figura 2). Esse comportamento não fora observado na avaliação anteriormente reportada (Tabela 1), e indica a presença de células com diferentes características de superfície nos dois experimentos, conduzidos de forma independente.

Em resumo, os resultados demonstram a necessidade da adoção de um estrito controle de processo durante a produção de suspensões celulares destinadas à quebra de emulsões. Neste caso específico, é sugerida a

densidade óptica como critério de controle e a utilização de cultura contínua, a qual possibilita a manutenção da cultura celular em um estado fisiológico praticamente inalterado.

Tabela 2 - Atividade desemulsificante (emulsão água em óleo – W/O) da *Acinetobacter* sp.LBBMA LU 3, em resposta à autoclavagem (121 °C, 20 minutos) ou ao congelamento (-20 °C, 24 h), seguido do descongelamento à temperatura ambiente.

TRATAMENTO	RQE (%)	CSQ (%)
Controle ¹	25,4 (1,3)	58,3 (2,9)
Suspensão autoclavada	31,9 (1,3)	73,3 (2,9)
Suspensão congelada/descongelada	31,9 (1,3)	73,3 (2,9)
Branco ²	5,1 (1,3)	12,5 (3,5)
dms _{0,05} ³	3,1	7,2

O micro-organismo foi cultivado em meio MMSM contendo parafina líquida como fonte de carbono, a 35 °C e 200 rpm, durante 22 horas. Utilizou-se 1 mL da suspensão celular (D.O₆₀₀ nm ajustada em 1,2 aproximadamente, em 9 mL de emulsão. A mistura foi agitada a 3.000 rpm e mantida a 35 °C por 24 horas. RQE (%) = razão de quebra de emulsão; CSQ (%) = capacidade de separação de querosene da emulsão. Os dados representam a média de três repetições. Os números entre parênteses indicam o desvio-padrão da média. ¹ – suspensão de células sem autoclavagem ou congelamento; ² – meio de cultura MMSM usado no lugar das suspensões celulares. ³ Diferença mínima significativa a $p = 0,05$.

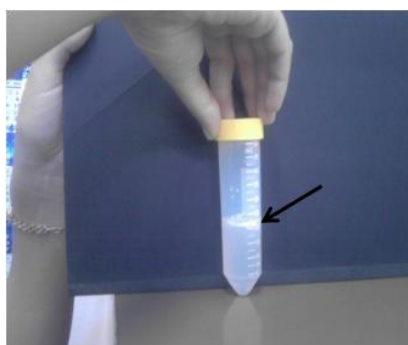


Figura 2 – Suspensão da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, após cultivo em meio MMSM contendo parafina líquida como fonte de carbono. A cultura foi incubada a 35 °C e 200 rpm por 22 horas. A suspensão celular foi transferida do frasco de cultivo para um tubo de centrifuga tipo Falcon de 50 mL, empregando-se uma bomba peristáltica e tubo Masterflex 13, inserido na parte inferior, de modo a se evitar a contaminação por parafina. É possível observar a formação de uma camada com alta concentração de células na parte superior da suspensão (seta), mesmo após a agitação em agitador de tubos na rotação máxima.

3. Efeito da acidez, da salinidade e da temperatura sobre a atividade desmulsificante

O ajuste do pH da fase aquosa entre 3 e 8, e da salinidade para valores entre 30 e 150 g L⁻¹ de NaCl, não teve efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a capacidade de quebra de emulsão ou sobre a capacidade de separação de querosene das células da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3 (dados não-apresentados). As médias dos valores de RQE e de CSQ no experimento com variação de pH foram de 30 % e 70 %, respectivamente, em todos os tratamentos. No experimento com variação da salinidade da fase aquosa, os valores de RQE situaram-se entre 26 e 30 %, e os de CSQ entre 60 e 70 % (dados não-apresentados).

O aumento da temperatura de incubação das emulsões W/O, na presença de células da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3, resultou em aumento linear tanto da RQE quanto da CSQ (Figura 3). A RQE variou entre 24 % (a 30 °C) e 32 % (a 60 °C). No mesmo intervalo, a CSQ variou entre 55 e 73 %. Esse resultado deve-se à redução da viscosidade dos fluidos que compõem a emulsão com o aumento da temperatura, à elevação da diferença de densidade entre as fases e ao enfraquecimento do filme interfacial responsável pela sua estabilidade, facilitando a coalescência das fases e, conseqüentemente, sua separação (Mohammed et al., 1994).

Foi observada variação entre repetições nas temperaturas mais baixas (30 a 40 °C), ao passo que nos tratamentos a 50 °C e a 60 °C, não houve variação entre as repetições. Assim, por esses resultados conclui-se que as operações de quebra de emulsões água em óleo, baseadas na utilização de células microbianas, devem ser conduzidas em temperaturas mais elevadas, por duas razões: maior eficiência e maior confiabilidade no processo. Levando-se em conta que a maior parte dos tanques de estocagem de óleo conta com sistemas de aquecimento para redução da viscosidade do material estocado, a aplicação do processo de desmulsificação em temperaturas elevadas pode se adaptar com relativa facilidade à cadeia produtiva do petróleo.

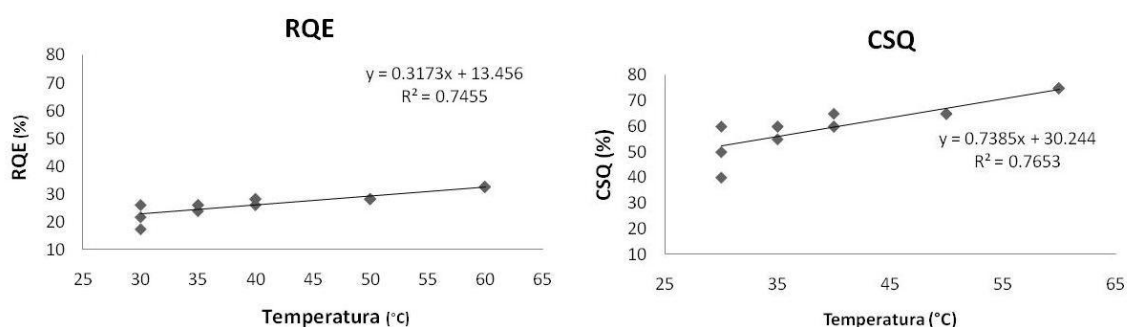


Figura 3 – Efeito da temperatura sobre a capacidade de quebra de emulsão (avaliada como Razão de Quebra de Emulsão – RQE) e sobre a capacidade de separação de querosene (CSQ) por células da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3. As células foram obtidas após 22 h de cultivo em meio MMSM-parafina (4% v:v), a 35 °C e 200 rpm. As células foram lavadas em solução salina estéril e ressuspensas em PBS, até uma DO_{600nm} de 1,2. A suspensão de células (1 mL) foi adicionada a 9 mL de emulsão água em óleo e a mistura incubada em repouso por 24 horas, nas temperaturas indicadas. As equações ajustadas foram significativas a $p = 0,01$.

Sumariamente, foi demonstrado que a capacidade de desemulsificação e de separação de querosene contido em emulsão W/O por *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3 é insensível a variações de pH e de salinidade. Resultados similares foram reportados por Cairns et al. (1982). A falta de sensibilidade aos fatores mencionados, somada à tolerância à autoclavagem e ao aumento da eficiência com o aumento da temperatura, demonstram que a utilização da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 3 (e eventualmente de outras obtidas neste estudo) em operações industriais é factível e altamente promissora.

4. Relação entre hidrofobicidade celular e capacidade de quebra de emulsão W/O

A relação entre a hidrofobicidade celular e a capacidade de quebra de emulsão W/O e de separação de querosene contido na emulsão foi avaliada utilizando-se três linhagens bacterianas. Duas linhagens foram obtidas neste estudo (*Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1 e LU 7a). A LBBMA 18-T é uma *Sphingomonas capsulata*, utilizada em estudos prévios de adesão a partículas de solos (Borges et al., 2008). As linhagens foram cultivadas em TSB e/ou R2A e adicionadas a meio mineral com carência de nitrogênio, onde foram incubadas durante sete dias. Esse procedimento foi realizado com vistas à

obtenção de células de uma mesma espécie, porém com diferentes valores de hidrofobicidade, avaliada por MATH.

A alteração da hidrofobicidade celular em resposta à manutenção em meio com carência de nitrogênio foi dependente da linhagem bacteriana e também da condição de cultivo prévio (Figura 4).

A hidrofobicidade celular da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1, durante a desnutrição das células, situou-se entre 40 e 62 %. As células cultivadas em TSB por 24 e 48 horas apresentaram hidrofobicidade de 74 % (dados não-apresentados). Não foi observada variação significativa da hidrofobicidade durante a manutenção em meio com carência de nitrogênio, exceto no tempo de desnutrição de 96 horas, quando essa característica foi superior à medida nos demais momentos. A hidrofobicidade voltou a cair, após 168 horas de desnutrição, para valor similar ao obtido entre zero e 72 horas de desnutrição.

A hidrofobicidade da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 7a decresceu com o aumento do tempo de incubação no meio de desnutrição (Figura 4). Esse decréscimo foi linear até 96 horas, após o que a hidrofobicidade aumentou de forma significativa. A hidrofobicidade celular dessa linhagem variou entre 16 (72 horas) e 32 % (tempo zero), sendo, portanto, menos hidrofóbica do que a LU 1.

A alteração da hidrofobicidade celular da *Sphingomonas capsulata* LBBMA 18T, em resposta à carência de nitrogênio, foi dependente do meio de cultura utilizado para a obtenção das células (Figura 4). Quando as células foram cultivadas em caldo TSB, observou-se uma queda da hidrofobicidade celular nas primeiras 24 horas após a transferência para o meio de desnutrição. Após esse período, a hidrofobicidade celular aumentou linear e significativamente, passando de 26 para 56 % no tempo 168 horas. Ao contrário, a hidrofobicidade das células cultivadas em meio R2A caiu linearmente após sua transferência para meio com carência de nitrogênio (Figura 4). Nessa condição, a hidrofobicidade situou-se entre 12,6 e 31 %, faixa similar à obtida com a *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 7a.

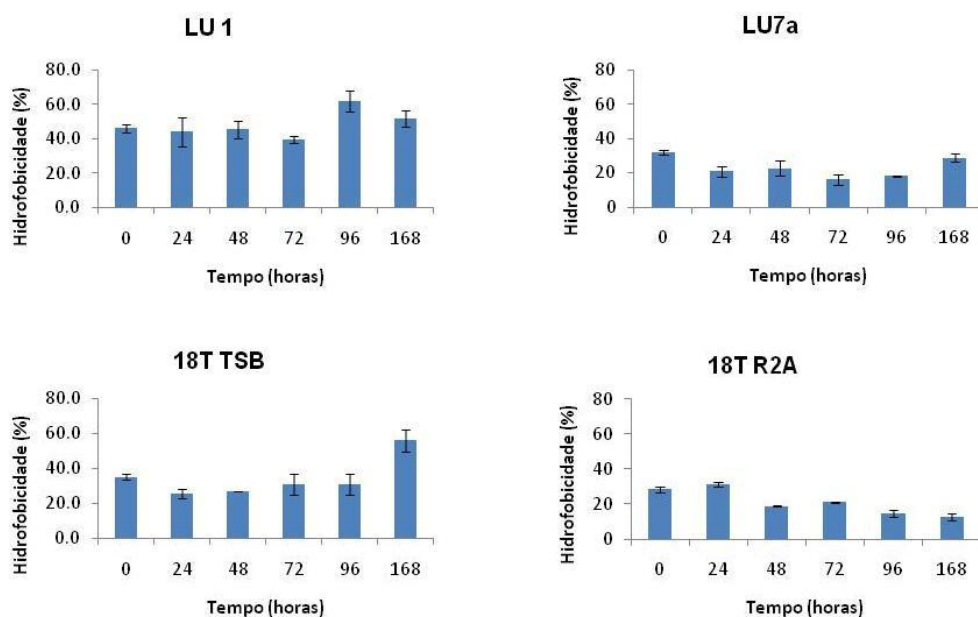


Figura 4 – Hidrofobicidade celular (método MATH) de linhagens bacterianas, após a transferência das células para meio de cultura com carência de nitrogênio. As células foram cultivadas em TSB por 6,5 horas (*Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1) ou 5 horas (*Acinetobacter* sp. LBBMA LU 7a e *Sphingomonas capsulata* LBBMA 18T), a 35 °C e 200 rpm. LBBMA foi cultivada também em R2A por 5 horas. Após lavagem em solução salina estéril, as células foram transferidas para o meio de desnutrição e incubadas nas mesmas condições. O tempo zero corresponde às células recém-coletadas do meio de cultivo. Os dados representam a média de três repetições. As barras de erro representam o desvio-padrão da média.

A hidrofobicidade da superfície celular de bactérias depende de uma variedade de componentes, incluindo os cetal-o-acetilados e cetal-piruvato de polissacarídeos ou glicoproteínas globulares, no glicocálice; os lipolissacarídeos, lipoproteínas, fosfolípidos e proteínas hidrofóbicas da membrana externa de bactérias gram-negativas; o ácido lipoteicoico da parede celular de bactérias gram-positivas e as extremidades acetiladas de polissacarídeos, como micoloil-arabinogalactanas de *Mycobacteria*, *Nocardia* e *Corynebacteria* (Kosaric, 1992). Elevada hidrofobicidade da superfície celular de muitas espécies está relacionada à presença de fímbrias e fibrilas hidrofóbicas, além de algumas moléculas pequenas presentes na superfície celular, como gramicidina S (Rosenberg et al., 1985) e prodigiosina (Rosenberg et al., 1989). Por outro lado, cápsulas e outros exopolissacarídeos aniônicos inibem a adesão a hidrocarbonetos, em razão da diminuição da hidrofobicidade

da superfície celular (Rosenberg et al., 1983). O efeito da carência de nitrogênio sobre a hidrofobicidade celular, nas condições experimentais deste trabalho, pode estar relacionado com a indução da síntese de exopolissacarídeos, conforme descrito por Wrangstadh et al. (1986). A síntese de EPS pode resultar em redução da hidrofobicidade, caso o EPS formado seja de natureza neutra ou hidrofílica (Caccavo et al., 1997) e o excesso de carbono em meio com limitação de nitrogênio é usado para produção de carboidratos, que são depositados fora da célula (Sanin et al., 2003). O recobrimento da superfície celular pelos grupos hidrofílicos dessas moléculas tem como resultado a redução de sua hidrofobicidade.

No presente trabalho, os resultados demonstram que essa generalização não é apropriada (Figura 4). Diferenças de comportamento de uma mesma espécie frente à carência de nitrogênio, conforme demonstrado com *S. capsulata* LBBMA 18T, são de difícil explicação e requerem a caracterização dos componentes de superfície celular formados durante a desnutrição, nas diferentes condições. Uma análise do teor de nitrogênio das células, após o cultivo nos diferentes meios de crescimento, e da relação C:N, antes e durante a desnutrição, também pode fornecer subsídios para esclarecimento das causas das diferenças de alteração da hidrofobicidade celular durante a desnutrição, como as demonstradas em *S. capsulata* LBBMA 18T cultivada em TSB e R2A (Figura 4).

Independentemente do efeito da carência de nitrogênio sobre a hidrofobicidade celular de linhagens individuais, a estratégia de manutenção das células em meio com deficiência desse elemento serviu ao propósito de se obterem células de uma mesma linhagem com diferentes valores de hidrofobicidade. A diferença entre a maior e a menor hidrofobicidade da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1 foi de 1,56 vezes. Esse valor foi de 1,99 com a *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 7a e de 2,18 e 2,48 vezes com a *S. capsulata* LBBMA 18T, cultivada em TSB e R2A, respectivamente. Tomando-se o conjunto de dados obtidos durante o experimento de desnutrição, a hidrofobicidade celular das linhagens bacterianas estudadas variou entre 12,6 e 62,3 %. Adicionalmente, as células da *Acinetobacter* sp. LBBMA LU 1, obtidas após o cultivo em TSB por 24 e 48 horas, apresentaram hidrofobicidade de 74 %, o maior valor obtido neste estudo.

A hidrofobicidade da superfície celular da *Acinetobacter sp.* LBBMA LU 1 e da *S. capsulata* LBBMA 18T cultivada em TSB não se correlaciona ($p > 0,05$) com a capacidade de quebra de emulsão W/O (RQE) ou com a capacidade de separação de querosene (CSQ) (dados não-apresentados). A hidrofobicidade das células da *S. capsulata* LBBMA 18T cultivada em R2A correlacionou-se negativamente com a RQE ($p < 0,05$; $r = -0,512$) e com a CSQ ($p < 0,05$; $r = -0,518$). Ao contrário, a hidrofobicidade de *Acinetobacter sp.* LBBMA LU 7a correlacionou-se positivamente com a RQE ($p < 0,05$; $r = 0,419$) e com a CSQ ($p < 0,01$; $r = 0,691$). Quando se consideraram todos os dados obtidos com as três linhagens, incluindo a *S. capsulata* LBBMA 18T cultivada nos dois meios de cultura e a *Acinetobacter sp.* LBBMA LU 1 cultivada em TSB por 24 e 48 horas, conclui-se que a hidrofobicidade celular se correlaciona negativamente com a RQE ($p < 0,01$; $r = -0,489$) e com a CSQ ($p < 0,05$; $r = -0,22$).

Os resultados mostram que, ao se considerar linhagens bacterianas individuais, não se encontra uma relação clara entre hidrofobicidade celular e capacidade de quebra de emulsão. Isso contrapõe, em parte, o proposto por outros autores (Kosaric, 1992; Stewart et al., 1983), de que células hidrofílicas são mais eficientes em promover a quebra de emulsões água em óleo. Essa contradição torna-se mais evidente quando se analisam os dados obtidos com a *Acinetobacter sp.* LBBMA LU 7a, com a qual se obteve maior eficiência de quebra de emulsão W/O e de separação de querosene à medida que as células se tornaram mais hidrofóbicas. De forma contrária, os resultados das correlações obtidas com a *S. capsulata* LBBMA 18T cultivada em R2A, previamente à desnutrição, e com o conjunto de dados de todas as linhagens, corroboram o proposto pelos referidos autores em seus trabalhos.

A diferença de correlação entre a capacidade de quebra de emulsão e a hidrofobicidade celular da *S. capsulata* LBBMA 18T cultivada em TSB e R2A, demonstra que outras características da superfície celular, além da sua hidrofobicidade, são determinantes para sua interação com as emulsões. Essas diferenças seguramente não foram causadas por componentes excretados no meio de cultivo/desnutrição ou pela concentração de células, uma vez que todos os ensaios de quebra de emulsão empregaram células lavadas e ressuspendidas em PBS, em concentração equivalente a uma DO_{600nm} em torno de 1,2. Considerando os relatos na literatura especializada, pode-se

afirmar que este é o primeiro relato desse tipo de interação. A natureza dos compostos ou de estruturas de superfície celular que impõem as diferenças descritas permanece por ser esclarecida.

CONCLUSÕES

A capacidade de quebra da emulsão água em óleo (W/O) das células de bactérias, de modo geral, diminui com a idade das culturas.

A atividade desemulsificante de culturas com até 22 horas foi atribuída à presença das células, não havendo influência de componentes excretados no meio de cultivo. A atividade desemulsificante de culturas mais velhas (168 horas) e, em especial, a capacidade de separar a fase oleosa, foram atribuídas à presença de compostos desemulsificantes sem atividade surfactante.

A atividade de quebra de emulsão W/O não envolveu a produção de moléculas com atividade surfactante. A falta de atividade desemulsificante com emulsões óleo em água dessas cepas sugere que a produção de biossurfactantes com ação desemulsificante é uma característica requerida para a quebra desse tipo de emulsão.

A atividade desemulsificante foi favorecida pelo aumento da temperatura de incubação da cultura, não sendo afetada por salinidade (até 150 g L⁻¹) ou pH (3-8).

Foi observada a existência de uma possível interação entre células sedimentáveis e não-sedimentáveis numa mesma cultura de algumas linhagens, a qual determina a sua atividade desemulsificante. Na literatura especializada, não se encontra registro desse comportamento em relação à atividade de quebra de emulsão W/O. Também, o efeito negativo de células não-sedimentáveis de algumas bactérias sobre a separação da fase oleosa em emulsão W/O representa conhecimento novo para a área.

A separação da fase oleosa presente na emulsão W/O é afetada negativamente por células não-sedimentáveis de algumas linhagens bacterianas.

A autoclavagem ou o congelamento/descongelamento de suspensões celulares de uma linhagem de *Acinetobacter* sp. não alteraram sua atividade desmulsificante. Conclui-se, portanto, que a integridade das células não é necessária para a atividade desmulsificante, e que esses tratamentos não são suficientes para degradar os componentes de superfície celular responsáveis pela mesma.

A alteração da hidrofobicidade celular em resposta à manutenção em meio com carência de nitrogênio foi dependente da linhagem bacteriana e também da condição de cultivo prévio.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, ao se considerarem linhagens bacterianas individuais, inexistiu uma relação definida entre hidrofobicidade celular e capacidade de quebra de emulsão W/O.

A hidrofobicidade celular correlaciona-se tanto positiva como negativamente com a capacidade de quebra de emulsão W/O e com a capacidade de separação de querosene contido na emulsão, dependendo da cepa bacteriana utilizada.

Outras características ou componentes da superfície celular bacteriana, além da sua hidrofobicidade, parecem ser determinantes para sua interação com as emulsões.

REFERÊNCIAS

- BICCA, C. F.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 30:273-280.
- BOGNOLO, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 152:41-52.
- BODOUR, A. A. & MILLER-MAIER, R. M. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 32:273-280.
- BORGES, M. T.; NASCIMENTO, A. G.; ROCHA, U. N.; TÓTOLA, M. R. 2008. Nitrogen starvation affects bacterial adhesion to soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:457-463.
- CACCAVO, F. JR.; SCHAMBERGER, P.C.; KEIDING, K.; NEILSON, P.H.; 1997. Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe (III) oxide. *Applied Environmental Microbiology*. 63(10):3837-3843.
- CAIRNS, W. L.; COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; WOOD, J. M.; KOSARIC, N. 1982. Characterization of *Nocardia amarae* as a potent biological coalescing agent of water-in-oil emulsions. *Applied Environmental Microbiology*. 43:362-366.
- CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V. & GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. 2004. Biotechnology of biemulsifiers produced by microorganisms. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2 (3,4):238-243.
- CLARK, C.E. & VEIL, J.A. 2009. *Produced Water Volumes and Management Practices in the United States*. U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN. 64p.
- CHRISTOFI, N. & IVSHINA, I.B. 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 915-929.
- DAS, M. 2001. Characterization of deemulsification capabilities of a *Micrococcus* sp. *Bioresource Technology*. 79:15-22.

- DESAI, J. D. & BANAT, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.
- DIKKERS, A.J. 1985. *Geology in Petroleum Production*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands. 254 p.
- DUVNJAK, Z., & KOSARIC, N. 1987. De-emulsification of petroleum water-in-oil emulsions by selected bacterial and yeast cells. *Biotechnology Letters*. 9:39–42.
- FERNANDES JÚNIOR, W.E. 2006. Projeto, Construção e Operação em Escala Semi-industrial de uma Unidade de Tratamento de Águas Produzidas na Indústria do Petróleo Utilizando Nova Tecnologia: Misturador-Decantador à Inversão de Fases. Tese de Doutorado, UFRN. 216P.
- FORERO, J. E.; ORTIZ, O.P.; NARIÑO, F. A.; DÍAZ, J.; PEÑA, H. 2008. Design and development of high efficiency tank for crude oil dehydration (I). *Ciencia, Tecnología y Futuro*. Vol. 3.4:185-199.
- GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, 10, 60-65.
- GRACE, R. Commercial emulsion breaking. In: Schramm, L. L., editor. 1992. *Emulsions: fundamentals and applications in the petroleum industry*. Washington, DC: American Chemical Society. 313-339.
- HERMAN, D.C., ZHANG, Y.; MILLER, R.M. 1997. Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3622-3627.
- HUANG, X. F.; LIU, J.; LU, L. J.; WEN, Y.; XU, J. C.; YANG, D. H.; ZHOU, Q. 2009. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresource Technology*. 100: 1358-1365.
- JANIYANI, K. L.; PUROHIT, H. J.; SHANKER, R.; KHANNA, P. 1994. Deemulsification of oil-in-water emulsions by *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10:452–456.
- KIM, K.Y.; LEE, J.J.; KIM, D.W.; LEE, J.C. 1998. De-emulsification of petroleum emulsion using *Nocardia amarae*. *Korea Journal Biotechnology Bioengineering*. 13, 209–213.
- KOSARIC, N. 1992. Biourfactants in industry. *Pure & Application Chemical*. Vol. 64, 11:1731-1737.
- KOSARIC, N.; DUVNJAK, Z.; CAIRNS, W. L.. 1987. De-emulsification of complex petroleum emulsions by use of microbial biomass. *Environmental Progress*. 6:33–38.

- LARSON, K.; RAGHURAMAN, B.; WIENCEK, J. 1994. Electrical and chemical de-emulsification techniques for microemulsion liquid membranes. *Journal of Membrane Science*. 91:231-248.
- LEE, R. F.; 1999. Agents which promote and stabilize water-in-oil emulsions. *Spill Science Technology Bulletin*. 5:117-126.
- LIU, J.; HUANG, X.F.; LU, L.J.; XU, J.C.; WEN, Y.; YANG, D. H.; ZHOU, Q. 2009. Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1. *Bioresource Technology*. 100:6481-6487.
- MANNING, F. C. & THOMPSON, R.E. 1995. Oilfield processing. Crude oil, vol. 2. Tulsa, Oklahoma: PennWell. In: Singh, A., Van Hamme, J.D. & Ward, O.P. 2006. Surfactants in Microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25, 99–121.
- MOHAMMED, R.A.; BAILY, A.I.; LUCKHAM, P. F.; TAYLOR, S.E. 1994. Dewatering of crude oil emulsions. 3. Emulsion resolution by chemical means. *Colloids Surfaces. A Physicochemical Engineering Aspects* 83:261–271.
- MULLIGAN, C.N., YONG, R.N., GIBBS, B.F., JAMES, S; BENNETT, H.P.J. 1999. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science & Technology*. 33: 3812-3820.
- NADARAJAH, N., SINGH, A.; WARD, O. P. 2002. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochemistry*. 37:1135–1141.
- NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. P. 2002. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-oil petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18:435–440.
- PARK, S.H.; LEE, J.H.; KO, S.H.; LEE, D. AND LEE, H.K., 2000. De-emulsification of oil-in-water emulsions by aerial spores of a *Streptomyces* sp. *Biotechnology Letter*. 22, 1389–1395.
- PLANCKAERT, M. Oil reservoirs and oil production. In: Ollivier, B. & Magot, M. (Eds.). *Petroleum Microbiology*. 2005. Washington, D.C: ASM Press. p. 3-19.
- RAMSAY, B.A.; D.G. COOPER; MARGARITIS, A.; ZAJIC, J.E.. 1983. *Rhodochorous* bacteria: biosurfactant production and demulsifying ability, p. 61–65. In: Zajic, J. E.; Cooper, D. G.; Jack, T. R. e Kosaric, N. (Eds.), *Microbial enhanced oil recovery*. PennWell, Tulsa, Okla.
- ROSENBERG, E.; BROWN, D. R.; DEMAINE, A. L. 1985. The influence of gramicidin S on hydrophobicity of germinating *Bacillus brevis* spores. *Archives of Microbiology*. 142:51–54.

- ROSENBERG, E.; KAPLAN, N.; PINES, O.; ROSENBERG, M.; GUTNICK, D. 1983. Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter*. FEMS Microbiology Letters. 17:157–161.
- ROSENBERG, E.; ROSENBERG, M.; SHOHAM, Y.; KAPLAN, N.; SAR, N. 1989. Adhesion and desorption during the growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on hydrocarbons. Y. Cohen, and E. Rosenberg. Microbial Mats. ASM Publications. Washington, DC, 218–226.
- SABATINI, D.A.; McINERNEY, M.J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T. 2006. Evaluation of sub-micellar synthetic surfactants versus biosurfactants for enhanced LNAPL recovery. Final Report, p.1-57.
- SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R. M. 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. Applied Environmental Microbiology. 66:4585-4588.
- SANIN, S.L.; SANIN, F.D.; BRYERS, J.D. 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. Process Biochemistry. 38:909-914.
- SPEIGHT, J.G. 2007. The Chemistry and Technology of Petroleum. Fourth Edition. CRC Press, Boca Raton, Fl. 954p.
- STEWART, A. L.; GRAY, N. C. C.; CAIRNS, W. L.; KOSARIC, N. 1983. Bacteria-induced deemulsification of water-in-oil petroleum emulsions. Biotechnology Letters. 5:725–730.
- TIBBETTS, P. J. C. Buchanan, I. T.; Gawel, L. J.; Large, R. 1992. Comprehensive determination of produced water composition. p. 97-112. In: Produced water: Technological Environmental Issue and Solutions., New York: J. P. Ray and F. R. Engelhardt, Plenum Press.
- THWAITE, J. E.; LAWS, T. R.; ATKINS, T. P.; ATKINS, H. S. 2009. Differential cell surface properties of vegetative *Bacillus*. Letters in Applied Microbiology. 48:373-378.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. 2006. Surfactants in Microbiology and Biotechnology: Part 1. Physiological Aspects. Biotechnology Advances, 24, 604-620.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology Molecular Biological Rev. 67:503-549.
- VEIL, J. A.; PRUDER, M. G.; ELCOCK, D.; REDWEIK Jr., R. J. 2004. A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas and coal bed methane: Argonne National Laboratory Report, W-31-109-Eng-38, 87 p.
- WARD, O. P. & SINGH, A. 1998. Biological process for breaking oil-water emulsions. U.S. patent no. 6,171,500.

WRANGSTADH, M., CONWAY, P.L., KJELLBERG, S., 1986. The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. *Archives of Microbiology*. 145(3):220-227.