



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO AMBIENTAL DE  
RAMNOLIPÍDIOS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADA DE RESÍDUOS  
DE PESCADO**

**LIGIA MACHADO PRIETO**

**Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert  
Orientador**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil  
Co-orientadora**

**RIO GRANDE-RS  
ABRIL, 2007**

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO AMBIENTAL DE  
RAMNOLIPÍDIOS DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADA DE RESÍDUOS  
DE PESCADO**

**LIGIA MACHADO PRIETO**

Dissertação apresentada como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert  
Orientador**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil  
Co-orientadora**

**RIO GRANDE-RS  
ABRIL, 2007**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmão, Marilú de Lourdes Machado Prieto e José Osni da Silva Prieto, Daniel Machado Prieto, pelo apoio que me deram desde a graduação até o mestrado, nunca deixaram de ser amigos e companheiros em todos os momentos difíceis de minha vida.

Ao meu orientador Carlos André e a minha co-orientadora Susana, pela orientação obtida neste período e pela compreensão.

A Janaína, por ter me ajudado a desenvolver parte de minha dissertação, com suas orientações na parte estatística.

A Elisane e a Ana, técnicas dos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e de Microbiologia de Alimentos, respectivamente, pela ajuda que me deram no desenvolvimento do trabalho, me auxiliando no uso de equipamentos e na realização de análises.

As minhas amigas Carol, Ana Paula, Francine e Fernanda, que ajudaram em minha adaptação em Rio Grande, saindo para jantar e indo a algumas festas. E por terem me consolado em alguns momentos difíceis de minha vida.

Aos meus bolsistas Mariano, Christielle, Rubens e Priscila que me ajudaram a desenvolver minha dissertação.

Ao meu namorado, Edevaldo Graffitti, por ter ficado ao meu lado nos momentos em que mais precisei de um ombro amigo e companheiro.

A Islanda por ter sido sempre amiga e muito solidária.

A Gicelda, Rosane, Kelly, Angelita e Priscila pela simpatia e por terem sido sempre muito prestativas.

A todos meus colegas da Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos e aos professores que auxiliaram na conclusão do curso.

A DEUS por nunca me deixar desistir, dar forças para enfrentar diversos obstáculos e nunca me abandonar.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao laboratório de Oceanografia Geológica e ao PRH-27 FURG-ANP/MCT pelo apoio na realização dos experimentos de biorremediação.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	ix
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivos Gerais	5
2.2. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO II	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Biossurfactantes	7
3.2. Aplicações dos Biossurfactantes	11
3.3. Fundamentos da Fermentação Submersa	14
3.4. Produção de Biossurfactantes por Microrganismos	15
3.5. Fundamentos da Biorremediação	19
3.6. Biossurfactantes Produzidos por Microrganismos para Aplicação em Biorremediação	21
CAPÍTULO III	23
ARTIGO 1	24
INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e sua caracterização parcial	24
RESUMO	25
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Microrganismo	28
2.2. Reativação da Cultura Estoque	28
2.3. Preparo do Inóculo	28
2.4. Cultivo em Frascos Agitados	28
2.4.1. Influência da fonte de carbono	29
2.4.2. Influência da fonte de nitrogênio	29
2.4.3. Influência da relação C/N	29
2.5. Caracterização do Biossurfactante	29
2.6. Análise Estatística	30
2.7. Determinações Analíticas	30
2.7.1. Índice de emulsificação	30
2.7.2. Determinação de ramnolipídios	31
2.7.3. Determinação da biomassa	31
2.7.4. Determinação do pH	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Influência da Fonte de Carbono	31
3.2. Influência da Fonte de Nitrogênio	34
3.3. Influência da Relação C/N	37
3.4. Caracterização do Biossurfactante	41
4. CONCLUSÕES	44

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ARTIGO 2	48
BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM SOLO POR DIFERENTES TÉCNICAS DE BIESTIMULAÇÃO	48
RESUMO	49
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Produção do Biossurfactante	51
2.2. Ensaio de Bioestimulação em Solo	52
2.3. Determinações Analíticas	53
2.3.1. Determinação de pH	53
2.3.2. Determinação de umidade	53
2.3.3. Determinação da temperatura	53
2.3.4. Determinação de hidrocarbonetos	53
2.3.5. Contagem de bactérias mesófilas	54
2.3.6. Contagem de bolores e leveduras	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1. Primeira Etapa	54
3.1.1. Monitoramento do pH, temperatura e umidade	54
3.1.2. Dinâmica da microbiota nativa	55
3.1.3. Biodegradação de petróleo	57
3.2. Segunda Etapa	59
3.2.1. Monitoramento do pH, temperatura e umidade	59
3.2.2. Dinâmica da microbiota nativa	60
3.2.3. Biodegradação de petróleo	61
4. CONCLUSÕES	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO IV	66
5. CONCLUSÕES GERAIS	67
CAPÍTULO V	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	76

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

Figura 1: Estrutura de alguns dos biossurfactantes. \_\_\_\_\_ 10

### ARTIGO 1

Figura 1: (a) Índice de emulsificação e (b) concentração de ramnose para diferentes fontes de carbono ao longo do tempo. \_\_\_\_\_ 32

Figura 2: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de carbono. \_\_\_\_\_ 33

Figura 3: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de carbono. \_\_\_\_\_ 34

Figura 4: (a) Índice de emulsificação e (b) concentração de ramnose para diferentes fontes de nitrogênio, ao longo do tempo. \_\_\_\_\_ 35

Figura 5: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de nitrogênio. \_\_\_\_\_ 36

Figura 6: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de nitrogênio. \_\_\_\_\_ 36

Figura 7: (a) Índice de emulsificação e (b) concentração de ramnose para diferentes relações C/N, ao longo do tempo. \_\_\_\_\_ 37

Figura 8: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes relações C/N. \_\_\_\_\_ 38

Figura 9: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes relações C/N. \_\_\_\_\_ 38

Figura 10: (a) Biomassa, (b) pH, (c) índice de emulsificação e (d) concentração de ramnose. \_\_\_\_\_ 40

Figura 11: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes concentrações salinas. \_\_\_\_\_ 41

Figura 12: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes pHs. 42

Figura 13: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes temperaturas. \_\_\_\_\_ 43

Figura 14: Índice de emulsificação médio $\pm$ desvio padrão para diferentes hidrocarbonetos. _____	43
ARTIGO 2	
Figura 1: Acompanhamento do pH. _____	55
Figura 2: (a) Contagem de bactérias mesófilas e (b) contagem de bolores e leveduras. _____	56
Figura 3: Acompanhamento da degradação de HTP. _____	58
Figura 4: Percentual de biodegradação de petróleo em solo contaminado. _____	58
Figura 5: Acompanhamento do pH. _____	60
Figura 6: (a) Contagem de bactérias mesófilas e (b) contagem de bolores e leveduras. _____	61
Figura 7: Percentual de biodegradação de petróleo em solo contaminado. _____	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética. _____	7
Tabela 2: Comparação entre as CMC de biossurfactante e surfactantes químicos. _____	9
Tabela 3: Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes. _____	14
Tabela 4: Tipos e origem microbiana de biossurfactantes. _____	17
Tabela 5: Biodegradação envolvendo biossurfactantes. _____	22
ARTIGO 2	
Tabela 1: Acompanhamento da degradação de HTP. _____	62



## RESUMO

Os biossurfactantes compreendem uma classe importante de compostos anfipáticos de origem microbiana. A bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida por sua habilidade de produzir biossurfactante do tipo ramnolipídio a partir de diversas fontes de carbono. A investigação da produção por novas linhagens pode resultar em processos mais eficientes, maiores rendimentos e biossurfactantes com características distintas, sendo aplicados em várias indústrias, tais como as indústrias farmacêutica, de cosméticos, de petróleo e de alimentos. Por outro lado, com o maior consumo de petróleo e derivados, cresceu a exposição de ambientes a possíveis acidentes relacionados à produção, transporte, carga e descarga desses materiais, sendo cada vez mais necessário buscarem-se alternativas tecnológicas para a recuperação desses ambientes. A biorremediação pode ser definida como o uso das potencialidades dos microrganismos em degradar compostos poluentes, reduzindo o grau de contaminação ou mesmo descontaminando ambientes degradados. Entre as técnicas disponíveis, a bioestimulação é uma das mais usadas, em que a microbiota nativa é estimulada pela adição de nutrientes e coadjuvantes como os biossurfactantes. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado capturado no extremo sul do Brasil, utilizando diversas fontes de carbono (óleo de soja, borra de óleo de soja, óleo de pescado, glicerol e glicose) e fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de amônio, uréia e sulfato de amônio), bem como diferentes relações C/N. O biossurfactante foi caracterizado quanto à influência de fatores físico-químicos na formação de emulsões. A degradação de petróleo em solo retirado de local próximo a um oleoduto, por técnicas de bioestimulação, com e sem a utilização do biossurfactante, também foi estudada. Os cultivos microbianos foram realizados em triplicata, sendo conduzidos em incubadora rotatória a 30°C e 180rpm, por um período de 96 horas. Pelo teste de Tukey, a 95% de confiança, o óleo de soja (40g/L) e o nitrato de sódio (8g/L) foram as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, obtendo-se, com uma relação C/N 22, 0,94g/L de ramnose e índice de emulsificação de 62,1%. Com uma relação C/N 100 foram produzidos 1,42g/L de ramnose e índice de emulsificação de 60,7%, indicando que a produção é favorecida em condição nitrogênio-limitante. A formação de emulsões estáveis foi melhor em concentrações salinas menores que 0,5%, pH na faixa de 6-9 e temperaturas na faixa de 35-40°C, mantendo cerca de 80% de sua atividade original para salinidade de até 3% e 120 min de exposição a 100°C. Quanto à biorremediação, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com adição de nutrientes e adição de nutrientes mais biossurfactante, com 90,4% e 80,9% de remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo, respectivamente, demonstrando efetiva melhoria em relação ao controle (42,2%), havendo uma clara relação entre a dinâmica da microbiota local e a biodegradação.

Palavras-chave: Biorremediação; Biossurfactante; Fermentação submersa; Hidrocarbonetos; Petróleo; *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

Biosurfactants consist of an important class of amphipathic compounds of microbial origin. The Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* is known for its ability to produce rhamnolipid-type biosurfactant from diverse carbon sources. The investigation of the production by new strains can result in more efficient processes, greater yields and biosurfactants with distinct characteristics, being applied in various industries, such as pharmaceuticals, cosmetics, oils and foods. On the other hand, with the huge consumption of petroleum and its derivatives, the exposure of environments to possible accidents related to the production, transport, loading and unloading of these materials has increased, making it necessary to search for technological alternatives to restore of these environments. Bioremediation can be defined as the use of the potential of microorganisms in degrading pollutant compounds, reducing the degree of their contamination or decontaminating degraded environments. Among the available techniques, biostimulation is one of most commonly used, where native microbiota is stimulated by the addition of nutrients and amendments as surfactants. This work had as its objective to study the production of biosurfactant from a strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish samples captured in the extreme south region of Brazil, using diverse carbon sources (soybean oil, soybean oil soapstock, fish oil and glycerol) and nitrogen sources (sodium nitrate, ammonium nitrate, urea and ammonium sulphate), as well as different C/N ratios. The biosurfactant was characterized taking into account the influence of physio-chemical factors in emulsion formation. The degradation of oil from the soil removed from a place next to a pipe-line in the region by different biostimulation techniques, with and without the use of the biosurfactant, also was studied. The microbial culture assays, carried out in triplicate, were conducted in a rotary shaker at 30 °C and 180rpm, for a period of 96 hours, and the results analyzed by the Tukey test. The soybean oil (40g/L) and the sodium nitrate (8g/L) were the best sources of carbon and nitrogen, respectively, obtaining with a C/N 22, 0.94 g/L of rhamnolipid and an emulsification index of 62.1%. With a C/N ratio 100, 1.42 g/L of rhamnolipid and an emulsification index of 60.7% were produced, indicating that the production is favored in a nitrogen-limiting condition. The formation of stable emulsions was better in saline concentrations less than 0.5%, pH in the range of 6-9 and temperatures in the range of 35-40 °C, maintaining about 80% of its original activity for salinity up to 3% and 120 min of exposure at 100 °C. For bioremediation, the best results were obtained in the treatments with addition of nutrients and addition of nutrients with more biosurfactant, with 90.4% and 80.9% of TPH removal, respectively, demonstrating effective improvement in relation to the control (42.2%), having a clear relation between the dynamics of local microbiota and the biodegradation.

Key words: Bioremediation; Biosurfactant; Hydrocarbons; Petroleum; *Pseudomonas aeruginosa*; Submerged fermentation.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com THASSITOU & ARVANITTOYANNIS (2001), a biorremediação é um conceito geral que inclui todos aqueles processos e ações que levam a biotransformação do ambiente, já modificado por contaminantes, para voltar ao seu estado original.

As técnicas de biorremediação podem ser usadas para descontaminação de solo e água e são classificadas em duas grandes categorias: *in situ* e *ex situ*. A biorremediação *in situ* envolve o incremento das taxas de biodegradação de contaminantes orgânicos no solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas. Requer a estimulação da atividade degradativa de populações microbianas endógenas pela provisão de nutrientes, aceptores de elétrons e outros compostos coadjuvantes, técnica conhecida como bioestimulação; ou a adição de inóculos microbianos exógenos com ou sem suplementação de nutrientes, que constitui a bioaugmentação. A biorremediação *ex situ* requer a remoção física do material contaminado seguido de tratamento em biorreatores, *landfarming*, biopilhas, compostagem e lagoas, utilizando as técnicas citadas.

A baixa solubilidade em água e a tendência a ser adsorvido em partículas de solo e sedimento são fatores que limitam a biodegradação de hidrocarbonetos, pois a biodisponibilidade é menor, conseqüentemente a etapa limitante do processo é a dessorção e dissolução do contaminante na fase aquosa e não a atividade dos microrganismos degradadores (COLLERAN, 1997).

O uso de surfactantes, moléculas que tem a propriedade de reduzir a tensão interfacial entre óleo e água, diminuindo o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciando o aumento da área interfacial, pode resultar em uma biodegradação mais eficiente em um processo de biorremediação. Ocorre aumento da biodisponibilidade do contaminante para os microrganismos degradadores, tornando a transferência de massa mais rápida e criando mais oportunidades para um contato direto entre as células e o substrato (MULLIGAN et al., 2001).

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes possuem características importantes frente aos surfactantes sintéticos geralmente utilizados, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução da tensão interfacial, solubilidade em meio alcalino,

estabilidade térmica e ao pH, sendo resistente a altas concentrações salinas (KIM et al., 1997).

No entanto, atualmente os biossurfactantes ainda não são amplamente utilizados, devido ao seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. Neste último aspecto, o uso de substratos renováveis, facilmente disponíveis e de baixo custo, pode contribuir para a viabilização da produção em larga escala.

Os biossurfactantes são classificados, de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana, em glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

Os biossurfactantes apresentam uma estrutura comum: uma porção lipofílica composta por uma cadeia carbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A classe dos glicolipídios compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos e uma porção glicídica. Nesta classe destacam-se os ramnolipídios produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico (GOUVEIA et al., 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* pode produzir ramnolipídios a partir de diferentes substratos, incluindo alcanos  $C_{11}$  e  $C_{12}$ , succinato, piruvato, citrato, frutose, glicerol, óleo de oliva, glicose e manitol. A produção de ramnolipídios parece ser um pré-requisito para a habilidade do microrganismo em crescer em meios com hidrocarbonetos pouco solúveis, portanto sua produção em geral é induzida na presença de substratos hidrofóbicos (MULLIGAN et al., 2001).

A equipe de pesquisadores dos Laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e de Microbiologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande desenvolvem pesquisas relacionadas à Biotecnologia Ambiental e Biorremediação desde 2002, quando RIBEIRO et al. (2002) isolaram bactérias hidrocarbonoclásticas de solo contaminado para aplicação

em bioaugmentação, com ênfase no aproveitamento do potencial fisiológico de linhagens microbianas provenientes do ecossistema costeiro do sul do Brasil.

Posteriormente, foram isolados fungos filamentosos a partir de solo contaminado na cidade do Rio Grande, extremo sul do Brasil, os quais foram identificados e caracterizados quanto à capacidade de crescimento em diferentes hidrocarbonetos, apresentando potencial degradativo para hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e clorados (BURKERT et al., 2004; SANTOS et al., 2004). O fungo *Aspergillus* sp. LEBM2, com potencial para biodegradação de fenol, foi utilizado em estudos de processos de bioaugmentação, utilizando microrganismos livres e encapsulados, com resultados promissores quanto à tolerância e às taxas de degradação (PASSOS et al., 2006).

QUINES et al. (2004) isolaram linhagens bacterianas a partir de amostras de resíduos de pescado capturados no extremo sul do Brasil, visando a produção de lipases. Uma destas linhagens foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* (ESSINGER et al., 2004), também apresentando potencial para a produção de biossurfactante do tipo ramnolipídio a partir de diferentes fontes de carbono, como óleo de soja, óleo de pescado e glicerol (BALBUENA et al., 2005). Neste contexto, o presente trabalho vem contribuir nesses estudos.

Desta forma, torna-se interessante estudar a produção de ramnolipídios de uma nova linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, disponíveis regionalmente, como óleos de origem vegetal e animal, bem como subprodutos de seu processamento. Além disso, a investigação dos fatores que influenciam na formação de emulsões óleo-água utilizando o biossurfactante, como concentração salina, pH e temperatura, bem como a verificação de seu comportamento e contribuição em um processo de biorremediação de solos, vem contribuir ao preenchimento de uma lacuna existente nesta área.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

- O objetivo geral deste trabalho foi investigar a produção de ramnolipídios a partir de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada pelo Laboratório de Microbiologia da FURG a partir de amostras de resíduos de pescado capturado na região de Rio Grande-RS, extremo sul do Brasil, utilizando fermentação submersa em frascos agitados, e sua aplicação em processos de biorremediação.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a influência da fonte de carbono, fonte de nitrogênio e relação C/N na produção de ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa* em frascos agitados;
- Caracterizar o produto obtido, verificando a influência da salinidade, pH, temperatura e hidrocarbonetos na formação de emulsões;
- Tratar o solo contaminado com petróleo por técnicas de bioestimulação, verificando a influência da adição de nutrientes e/ou ramnolipídios na eficiência da biodegradação.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biossurfactantes

O termo biossurfactante é dado estritamente a um surfactante obtido diretamente de uma fonte natural, tais como plantas, animais ou microrganismos e que poderá ser isolado por qualquer método de separação, como exemplo, extração, precipitação ou destilação, não havendo síntese orgânica envolvida (LIMA et al., 2002).

Em sistemas biológicos, agentes com atividade de superfície são usados da mesma forma que os surfactantes são utilizados nos sistemas técnicos, atuando como emulsionantes, dispersantes para modificações em superfícies, entre outros (GARTI, 1999).

Surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos quando obtidos a partir de sínteses químicas, ou biossurfactantes quando produzidos por microrganismos ou a partir de outras fontes naturais (CASSIDY & HUDAK, 2001; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; KOSARIC et al., 1987). A parte hidrofóbica é composta por longas cadeias de ácidos graxos, hidróxi ácidos ou alquil- $\beta$ -hidroxiácidos graxos, enquanto que a parte hidrofílica pode ser composta de carboidratos, aminoácidos, peptídios cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou álcoois (SANTA ANNA, 2000). A Tabela 1 mostra os principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

**Tabela 1:** Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Surfactantes Naturais	Surfactantes Sintéticos
Alquil poliglicosídios	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glicamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Amino óxidos
Sorbitol e estéres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Os biossurfactantes são produzidos principalmente por microrganismos aeróbios, em meio aquoso, a partir de uma fonte de carbono, como carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou mistura destes. Estes compostos são excretados dentro do meio de cultura durante o crescimento do microrganismo e ajudam no transporte de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999).

Todos os biossurfactantes são aniônicos ou não-iônicos. Na literatura não existem relatos de estruturas catiônicas. De qualquer maneira em alguns momentos a presença de grupos que contêm nitrogênio concede, até certo ponto, um caráter catiônico à parte da molécula, afetando, por exemplo, a adsorção dos sólidos dispersos e a floculação de partículas (BOGNOLO, 1999).

Em relação aos surfactantes convencionais, os biossurfactantes apresentam características e vantagens distintas, como (BOGNOLO, 1999):

#### **Tolerância à temperatura**

Alguns biossurfactantes e suas atividades superficiais não são afetados por temperaturas até 90°C.

#### **Atividade de superfície e interface**

Os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que, por exemplo, compostos sulfonados aniônicos, já que reduzem a tensão superficial mais rapidamente. Os biossurfactantes de alto peso molecular adsorvem na interface óleo-água através de múltiplos pontos de ancoragem e aumentam a estabilidade das cadeias na fase contínua o que produz uma efetiva estabilidade estérica. A grande área interfacial coberta pela molécula adsorvida e a multiplicidade de pontos de ancoragem asseguram que não ocorra dessorção durante a colisão de partículas, e aumentam grandemente a estabilidade das emulsões.

#### **Tolerância à força iônica**

Os biossurfactantes não precipitam em soluções salinas de até 10%, enquanto que soluções de 2-3% de sal são eficientes para desativar os surfactantes químicos.

#### **Biodegradabilidade**

Os biossurfactantes são facilmente degradados na água ou no solo.

### Quebra de Emulsões

Emulsões feitas com biossurfactantes podem facilmente ser quebradas por adição de enzimas, como, por exemplo, a depolimerase, que pode quebrar a emulsão de hidrocarbonetos em óleo.

Os biossurfactantes apresentam ainda a vantagem de poder ser sintetizados a partir de substratos renováveis e de possuir grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Outra vantagem dos biossurfactantes reside no fato de não serem compostos derivados do petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. Além disso, a estrutura química e as propriedades físicas dos biossurfactantes podem ser modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de novos produtos para necessidades específicas (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes apresentam uma concentração micelar crítica (CMC) pequena quando comparada com a de surfactantes químicos, como mostra a Tabela 2. CMC é a concentração de surfactante na qual se observa uma abrupta diminuição na tensão superficial do sistema (FOX & BALA, 2000).

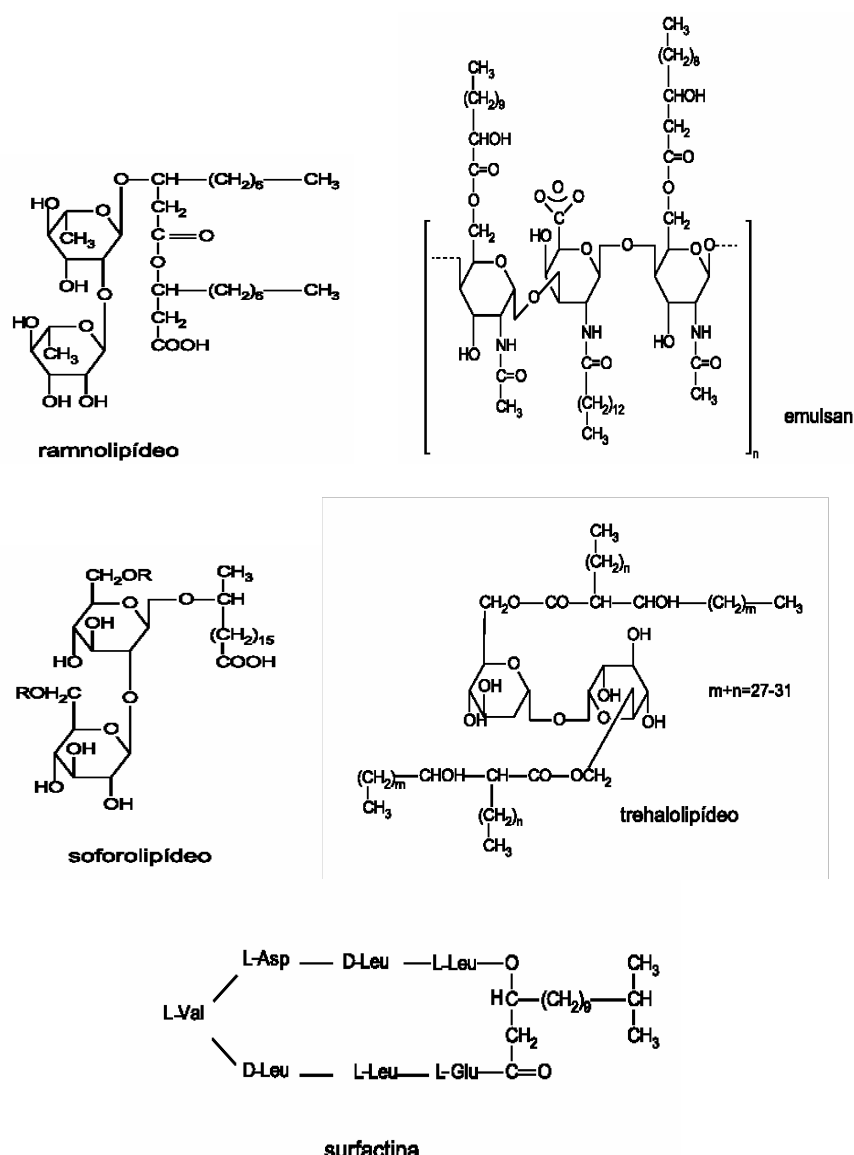
**Tabela 2:** Comparação entre a concentração micelar crítica de biossurfactantes e surfactantes químicos (BOGNOLO, 1999).

Origem	Tipo de Surfactante	CMC (mg/L)
Naturais	Ramnolipídios	20
	Surfactina	11
Químicos	Sulfato de alquibenzeno linear	590
	Lauril sulfato de sódio	2000-2900

Os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares (CHAMPION et al., 1995). Estas acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/óleo). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações

hidrofóbicas e hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade (SANTA ANNA, 2000).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A Figura 1 mostra a estrutura de alguns dos biossurfactantes.



**Figura 1:** Estrutura de alguns dos biossurfactantes (NITSCHKE & PASTORE, 2003).

### **3.2. Aplicações dos Biossurfactantes**

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais, conforme a seguir (NITSCHKE & PASTORE, 2002):

#### **Biorremediação**

Como os biossurfactantes aumentam a interação superficial água-óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta 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; entretanto, os estudos ainda ocorrem a nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfactantes permanece ainda como um desafio.

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismo nativos capazes de produzir estes compostos.

#### **Limpeza de reservatórios de óleos**

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo-água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes

carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático.

### **Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)**

A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, melhorando a movimentação do óleo através dos poros da rocha.

### **Aplicações terapêuticas**

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral. O biossurfactante produzido por *R. erythropolis* inibe o vírus do herpes simples e vírus parainfluenza. A iturina, lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, apresenta atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras. A inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfactante produzido por *Lactobacillus* também já foi relatada.

### **Biossurfactantes na agricultura**

Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Surfactantes de *Bacillus* são utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis. Os ramnolipídios possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos.

### **Biossurfactantes na mineração**

Compostos tenso-ativos produzidos por culturas de *Pseudomonas sp.* e *Alcaligenes sp.* têm aplicação na flotação e separação de calcita e eschelita. O biodispersan, polissacarídeo aniônico, produzido por *A. calcoaceticus* A2, previne a floculação e dispersão de misturas de pedra calcárea e água.

### **Produtos de higiene e cosméticos**

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. Um produto comercial com 1 mol de soforolipídios e 12 moles de propilenoglicol, com excelente compatibilidade dérmica, é utilizado como hidratante em cremes faciais. Alguns soforolipídios são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. Ltda desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídios, que posteriormente sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelo. A preparação de biossurfactantes pela ação enzimática (principalmente lipases) sobre moléculas hidrofóbicas promove um novo direcionamento na produção destes compostos, principalmente para utilização em produtos de higiene e cosméticos.

### **Indústria de alimentos**

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras. O bioemulsificante produzido por *C.utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas.

### **Outras aplicações**

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil e cerâmica. O biodispersante tem aplicação na indústria de tintas, pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura. As propriedades de estabilização de espuma são necessárias na fabricação de extintores de incêndio.

A Tabela 3 apresenta um resumo das funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

**Tabela 3:** Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes (NITSHKE & PASTORE, 2002).

Funções	Campos de Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e higiênicos
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes emulsificantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas, alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos
Fator de crescimento microbiano	Tratamentos de resíduos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulação, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcário-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

### 3.3. Fundamentos da Fermentação Submersa

Os bioprodutos geralmente são produzidos em escala industrial através de dois sistemas de fermentação, conforme a quantidade de água presente no meio, e são classificados como fermentação submersa ou fermentação em estado sólido (REGULY, 2000).

As fermentações requerem em primeiro lugar um substrato ou nutriente, este é geralmente um açúcar, como sacarose, glicose ou lactose, mas também pode ser um produto residual. O uso de produtos de descarte proporciona um nutriente potencialmente mais econômico que o uso de substratos puros. Em segundo lugar necessita-se de uma fonte de nitrogênio e finalmente nutrientes em menor quantidade e vitaminas (WAINWRIGHT, 1995).

Em cultura submersa, um grande número de fatores contribui para o desenvolvimento de qualquer forma morfológica. Fatores que afetam o processo incluem o tipo e concentração da fonte de carbono, níveis de nitrogênio e fósforo, traços de minerais, oxigênio dissolvido e gás carbônico, pH e temperatura, bem como geometria do



fermentador, sistemas de agitação, reologia e os métodos de cultivo, se em batelada, batelada alimentada ou contínua (PAPAGIANNI, 2004).

Na fermentação submersa, o microrganismo introduzido no meio como inóculo, se desenvolve no meio líquido. Quando comparado com o método de fermentação em estado sólido, apresenta as seguintes vantagens (REGULY, 2000):

- O meio de cultivo pode ser variado mais facilmente;
- A superfície celular do agente fica inteiramente exposta ao meio, facilitando as trocas (absorção e excreção);
- A esterilização de um meio líquido é mais fácil do que a de um meio semi-sólido;
- A aeração estéril de meio líquido em fermentador é menos dispendiosa e problemática do que a condução de muito maior volume de ar, também estéril, que seria necessário para aerar eficientemente um cultivo em estado sólido em bandejas;
- O cultivo submerso pode ser transformado em cultivo contínuo, quando a sua cinética o permite.

### **3.4. Produção de Biossurfactantes por Microrganismos**

A composição e o rendimento dos biossurfactantes dependem das características do fermentador, do pH do meio, da composição dos nutrientes, do substrato e da temperatura utilizada (MULLIGAN et al., 2001).

Existem microrganismos que sintetizam surfactantes crescendo em diferentes substratos desde carboidratos até hidrocarbonetos (COOPER, 1986). Alguns dos surfactantes produzidos por microrganismos não são constitutivos, requerendo a presença de alcanos ou outros compostos hidrofóbicos para induzirem sua síntese. Por outro lado, vários autores constataram que a produção de biossurfactantes pode ocorrer mesmo crescendo em outras fontes que não hidrocarbonetos. WASCO & BRATT (1990), citado por GAYLARDE (2000), sugerem que o processo pode ser constitutivo e não induzido em função da produção de surfactante por *Ochrobactrum anthropii*, um contaminante de óleo diesel, em meio com glicose e meio mineral Bushnell-Haas, sem a presença de hidrocarbonetos. Os microrganismos, então, podem apresentar produção de

surfactantes, seja crescendo em substratos insolúveis (óleos, graxas e outros hidrocarbonetos), como relatado por RATLEDGE (1988), ou em substratos solúveis (carboidratos), como descrito por CARRILLO et al. (1996), citados por GAYLARDE (2000).

O sucesso da produção industrial de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de matérias primas de baixo custo, uma vez que estas representam entre 10 e 30% do custo total. Apesar disto, poucos trabalhos têm sido publicados com vistas a produzir biossurfactantes a partir de resíduos. Em geral, substratos agroindustriais que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídios suprem a necessidade de fonte de carbono para produção de biossurfactantes. O estabelecimento de um processo biotecnológico a partir desses substratos alternativos também apresenta outra dificuldade, que é a padronização devido às variações naturais de composição, bem como os custos com transporte, armazenagem e tratamento prévio necessário. Entretanto, a utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes são produzidos por microrganismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos. Alguns podem ser produzidos por microrganismos halotolerantes (BEJAR et al., 1997), como também por microrganismos termotolerantes (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997).

Entre os biossurfactantes de menor peso molecular um dos mais estudados é o glicolipídio ramnolipídio produzido por *Pseudomonas*, constituído de 1 a 2 moles de ramnose e 1 a 2 moles de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico.

Os biossurfactantes de alto peso molecular são compostos de polissacarídios, proteínas, lipopolissacarídios, lipoproteínas ou misturas complexas destes biopolímeros, sendo menos efetivos na redução da tensão interfacial e mais efetivos na prevenção de coalescência.

A Tabela 4 apresenta vários tipos de biossurfactantes com seus respectivos microrganismos produtores.

**Tabela 4:** Tipos e origem microbiana de biossurfactantes (MULLIGAN, 2005).

Microrganismo	Tipo de Biossurfactante
<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia sp.</i>	Lipídios com trealose
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Serratia rubidea</i>	Ramnolipídios
<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>	Lipídios sophorose
<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurella sp.</i>	Glicolipídios
<i>Ustilago maydis</i>	Lipídios com celobiose
<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>	Poliol lipídios
<i>Lactobacillus fermentii</i>	Diglicosil diglicerídios
<i>Acinetobacter calcoaceticus (RAG1)</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida lipolytica</i>	Lipopolissacarídios
<i>Arthrobacter sp.</i>	Arthrofactina
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenysina A, B
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Surfactina
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosina
<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>	Ornitina, peptídios com lisina
<i>Acinetobacter sp.</i>	Fosfolipídios
<i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	Sulfonil lipídios
<i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>	Ácidos graxos (ácidos corinomicólicos, ácidos spiculispóricos)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactina
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Biosur PM

COOPER et al. (1986) estudaram a produção do lipopeptídeo surfactina utilizando meio contendo glicose como fonte de carbono com remoção contínua do produto por fracionamento por espuma. O rendimento também foi incrementado pela adição de sais de ferro e manganês. A adição de hidrocarbonetos no meio inibiu completamente a produção de surfactina.

KIM et al. (1997) produziram um biossurfactante lipopeptídeo utilizando *Bacillus subtilis* C9. Na presença de hidrocarbonetos, houve inibição da produção do biossurfactante, sendo a produção favorecida com glicose como fonte de carbono e em condições limitantes de oxigênio.

LIN et al. (1998) utilizaram um mutante de *Bacillus licheniformis*, que produziu um biossurfactante lipopeptídico em concentração de 391mg/L. Para tal, foi utilizado meio mineral suplementado com glicose e incubado a 42 °C e 200rpm.

LINHARDT et al. (1998) utilizaram cepa de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em frascos agitados contendo meio composto por sais, óleo de milho e/ou glicose como fontes de carbono, a pH 6,5. Os frascos foram incubados a 37°C e 200rpm de agitação por 6 dias. Observou-se maior produção utilizando-se somente óleo de milho (40g/L) como fonte de carbono, com altos níveis de produção de ramnolipídios (5,4g/L de ramnose).

No trabalho de SCHIMID et al. (1998) é mencionado que *Pseudomonas oleovorans* produziu grandes quantidades de biossurfactantes em cultivo em meio à base de n-octano.

FOX & BALA (2000) utilizaram meios líquidos e sólido contendo batata como fonte de carbono para produzir biossurfactantes utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Os experimentos foram realizados em frascos agitados, acompanhando-se o crescimento, tensão superficial e carboidratos totais. As tensões superficiais diminuíram de 71,3 para 28,3 (meio sólido) e 27,5mN/m (meio líquido).

No trabalho de BENINCASA et al. (2002), uma cepa bacteriana foi isolada de solo contaminado com petróleo e identificada como *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Esta produziu ramnolipídios em meio à base de sais minerais e diferentes fontes de carbono: óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de soja, oleína e borra de óleo de girassol como única fonte de carbono. Com meio contendo borra e  $K_a$  de 169,9h<sup>-1</sup> atingiu-se uma concentração máxima de 15,9g/L, utilizando batelada alimentada em biorreatores de bancada.

O potencial em produzir ramnolipídio foi estudado por SANTA ANNA et al. (2002) para *Pseudomonas aeruginosa* PA1, isolada de campos de petróleo do nordeste do Brasil. O melhor resultado foi usando o glicerol e nitrato de sódio com relação C/N 60, produzindo 3,16g/L de ramnolipídios.

GOUVEIA et al. (2003) estudaram a produção de biossurfactantes ramnolipídicos por bactérias isoladas de poços de petróleo. Estas foram identificadas em sua maioria como *Pseudomonas aeruginosa*. Foram acompanhados a tensão superficial,

concentração de ramnose e a concentração de biomassa. O glicerol foi a fonte de carbono mais adequada, com produtividade superior a 0,007g/L.h.

NITSCHKE et al. (2003) estudaram, através de isolados de *Bacillus*, a produção de biossurfactante utilizando melaço, manipueira, soro de leite e meio sintético. Entre os resíduos agroindustriais testados, a manipueira foi o que demonstrou o melhor potencial para uso como substrato alternativo na produção de biossurfactantes por isolados de *Bacillus*, sendo que o composto obtido apresentou capacidade para o uso em biorremediação de poluentes e em recuperação de petróleo.

BEDNARSKI et al. (2004) usaram *Candida antarctica* ATCC 20509 e *Candida apicola* ATCC 96134 para a produção de biossurfactantes (glicolipídios) utilizando meio de cultivo suplementado com resíduos de refino de óleo (5 % a 12% v/v) e ácidos graxos (2 a 5% v/v). A eficiência de síntese com a utilização de borra foi 7,5-8,3 vezes maior que o obtido com o meio não suplementado. A biomassa obtida variou de 8,2 a 10,3 g/L e o conteúdo de lipídios de 16,8% a 30,20%. O alto conteúdo de lipídios na célula de leveduras confirma a correlação entre a síntese de glicolipídios e a capacidade da levedura de sintetizar lipídios.

COSTA et al. (2006) estudaram o potencial dos óleos nativos das plantas brasileiras, como substrato, para *Pseudomonas aeruginosa* LBI produzir biossurfactante. Os óleos que apresentaram melhor potencial foram o de castanha e de maracujá, produzindo 9,9g/L e 9,2g/L de ramnolipídios, respectivamente.

### 3.5. Fundamentos da Biorremediação

Avanços na ciência e tecnologia desde a revolução industrial têm aumentado os esforços humanos para exploração de recursos naturais. Entretanto, isto tem gerado distúrbios sem precedentes em ciclos ambientais elementares. A súbita introdução de xenobióticos, ou a massiva relocação de materiais naturais, pode afetar a capacidade de auto limpeza dos ecossistemas e isto resulta na acumulação de poluentes a níveis alarmantes (RAHMAN et al., 2002).

Os processos de biorremediação são tecnologias que utilizam organismos viáveis, especialmente microrganismos selecionados através de funções catabólicas, para

degradação de substâncias químicas tóxicas presentes no solo e água em outras menos tóxicas, não tóxicas, ou redução de sua concentração a níveis aceitáveis. Estes microrganismos transformam o óleo em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes menos tóxicos. O objetivo da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade microbiana (CAPREZ, 2002).

As técnicas de biorremediação podem ser usadas para descontaminação de solo e água e são classificadas em duas grandes categorias: *in situ* e *ex situ*.

A biorremediação *in situ* envolve o incremento das taxas de biodegradação de contaminantes orgânicos no solo, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas. Requer a estimulação da atividade degradativa de populações microbianas endógenas pela provisão de nutrientes e aceptores de elétrons, ou a adição de inóculos microbianos exógenos com ou sem suplementação de nutrientes.

A biorremediação *ex situ* requer a remoção física do material contaminado (usualmente solo ou sedimentos) seguido de tratamento em biorreatores, landfarming, biopilhas, compostagem e lagoas (COLLERAN, 1997).

As estratégias de tratamento *in situ* podem diminuir os custos em relação as técnicas *ex situ*, pela eliminação da necessidade de escavação, transporte e estocagem (GHAZALI, 2001).

O processo de bioaugmentação envolve a introdução de microrganismos cultivados para degradar várias cadeias de hidrocarbonetos dentro de um sistema contaminado. As culturas podem ser derivadas de um solo contaminado ou obtidas de uma cultura estoque que tenha demonstrado, previamente, capacidade para degradar hidrocarbonetos (SARKAR et al., 2005).

O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos em um sistema contaminado, o que causa o aumento da população de microrganismos nativos. Os microrganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação do número de microrganismos causado pelo aumento dos níveis de nutrientes (SARKAR et al., 2005).

Os trabalhos de biorremediação devem ser feitos tanto no ambiente quanto em condições controladas de laboratório, para obter informações que permitam estimar custo, viabilidade e duração de tratamento, e para identificar os fatores limitantes do processo e as vias possíveis de superação dos mesmos. A eficiência da tecnologia é testada em laboratório, pela determinação da biomassa da população, a quantificação da atividade de enzimas ligadas a degradação do óleo e a determinação das taxas de degradação do poluente (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

### **3.6. Biossurfactantes Produzidos por Microrganismos para Aplicação em Biorremediação**

RAHMAN et al. (2002) observaram degradação de 78% de hidrocarbonetos em solo contaminado com gasolina após 60 dias de tratamento com adição de 1% de aditivo contendo biossurfactante ramnolipídico de *Pseudomonas* sp. DS 10-129.

RAHMAN et al. (2003) investigaram a possibilidade de usar diferentes métodos para aumentar a taxa de biodegradação de óleo. Foram testados a bioaugmentação e a bioestimulação. Bioaugmentação utilizando um consórcio bacteriano seguido pela adição de ramnolipídios e nutrientes NPK a um solo contaminado com 10% de óleo incrementou a taxa de biodegradação. Em 56 dias, a redução de n-alcenos nC8-nC11 foi de 100% e de n-alcenos nC12-C21 foi de 83-98%.

MILLOLLI & SANTOS (2004a) avaliaram a potencialidade do uso de um biossurfactante do tipo ramnolipídico no processo de biodegradação de solo contaminado com óleo cru. Verificou-se um bom percentual de remoção (19,8%) confirmando que o biossurfactante aumentou a disponibilidade dos hidrocarbonetos para a ação dos microrganismos, quando apenas o biossurfactante é utilizado na remediação.

MILLIOLLI & SANTOS (2004b) avaliaram a concentração ótima de biossurfactante no processo de biorremediação de solo contaminado por óleo cru. Foram conduzidos diferentes ensaios, para acompanhar a biorremediação. Os índices de biodegradação dos experimentos que tiveram adição de biossurfactante variaram entre 21,4 e 41,6%, resultados bem acima do controle estimulado (5%).

PERFUMO et al. (2007) estudaram a influência de altas temperaturas nas taxas de degradação de hidrocarbonetos e avaliaram os efeitos de diferentes bioestimulantes. Foi adicionado um biossurfactante de ramnolípido para degradar um alcano, nas temperaturas de 18-60°C, obtendo assim degradação de 71% e 42%, respectivamente. Na degradação do hexadecano utilizando a bioaugmentação, na temperatura de 60°C, obteve-se uma degradação de 70%.

A Tabela 5 mostra algumas aplicações de biossurfactantes na biodegradação de poluentes.

**Tabela 5:** Biodegradação envolvendo biossurfactantes (BEJAR et al., 1997).

Biossurfactante	Meio	Microrganismo	Contaminante
Ramnolípido	Lodo	<i>P. aeruginosa</i>	Hexaclorobifenil
Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos
Ramnolípido	Lodo	<i>P. aeruginosa</i>	Fenantreno
Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Fenantreno e hexadecano
Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Fenantreno, fluorantreno, pireno, pentaclorofenol, benzopireno
Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Naftaleno e fenantreno
Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Octadecano
Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Fenantreno e cádmio
Mono- Ramnolípido	Solo	<i>P. aeruginosa</i>	Naftaleno e cádmio
Di- Ramnolípido	Líquido	<i>Pseudomonas</i>	Tolueno, etilbenzeno, butilbenzeno,
Sophorolípido	Líquido	<i>Cultura Mista</i>	Alcanos (C <sub>14-16</sub> ), pristano, fenildecano, naftaleno
Sophorolípido	Solo	<i>C. bombicola</i> <i>ATCC2214</i>	Fenantreno
Surfactina Crua	Solo	<i>B. subtilis</i> ATCC2423	Hexadecano e querosene
Surfactina Crua	Solo	<i>B. subtilis</i> ATCC2423	Endosulfana
Surfactina Crua	Água do Mar	<i>B. subtilis</i> O9	Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos
Alasan	Líquido	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	Fenantreno, fluorantreno e pireno



**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

**ARTIGO 1**

**INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO  
DE RAMNOLIPÍDIOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E SUA  
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

---

## INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E SUA CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

### RESUMO

Os biossurfactantes compreendem uma classe importante de compostos anfipáticos de origem microbiana. A bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida por sua habilidade de produzir biossurfactante do tipo ramnolipídio a partir de diversas fontes de carbono. A investigação da produção por novas linhagens pode resultar em processos mais eficientes, maiores rendimentos e biossurfactantes com características distintas, sendo aplicados em várias indústrias, tais como as indústrias farmacêutica, de cosméticos, de petróleo e de alimentos. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de ramnolipídio a partir de linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de amostras de resíduos de pescado capturados na região de Rio Grande, extremo sul do Brasil, utilizando diversas fontes de carbono (óleo de soja, borra de óleo de soja, óleo de pescado, glicerol e glicose) e fontes de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de amônio, uréia e sulfato de amônio). Com as fontes de carbono e nitrogênio selecionadas, diferentes relações C/N foram testadas (10 a 100) e o biossurfactante obtido foi caracterizado. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo conduzidos em incubadora rotatória a 30°C e 180rpm, por um período de 96 horas, sendo os resultados analisados pelo teste de Tukey. O óleo de soja e o nitrato de sódio foram as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, obtendo-se, com uma relação C/N 22, 0,94g/L de ramnose. Com uma relação C/N 100 foram produzidos 1,42g/L de ramnose. A formação de emulsões estáveis foi melhor em concentrações salinas menores que 0,5%, pH na faixa de 6-9 e temperaturas na faixa de 35-40°C, mantendo cerca de 80% de sua atividade original para salinidade de até 3% e 120min de exposição a 100°C.

Palavras-chave: Bactéria; Biossurfactante; Fermentação submersa.

---

## INFLUENCE OF CARBON AND NITROGEN SOURCES IN THE PRODUCTION OF RHAMNOLIPID FROM *Pseudomonas aeruginosa* AND ITS PARTIAL CHARACTERIZATION

### ABSTRACT

Biosurfactants consist of an important class of amphipathic compounds of microbial origin. The Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* is known for its ability to produce rhamnolipid type biosurfactant from diverse carbon sources. The investigation of the production with new strains can result in more efficient processes, greater yields and biosurfactants with distinct characteristics, being applied in various industries, such as pharmaceutical, cosmetics, oils and foods. This work had as its objective to study the production of biosurfactant from a strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish samples captured in the region of Rio Grande, extreme south region of Brazil, using diverse carbon sources (soybean oil, soybean oil soapstock, fish oil, glycerol and glucose) and nitrogen sources (sodium nitrate, ammonium nitrate, urea and ammonium sulphate). With the selected sources of carbon and nitrogen, different C/N ratios were tested (10 to 100). The assays, carried out in triplicate, were conducted in a rotary shaker at 30°C and 180rpm, for a period of 96 hours, and the results analyzed by the Tukey test. The soybean oil and the sodium nitrate were the best sources of carbon and nitrogen, respectively, obtaining, with a C/N ratio of 22, 0.94g/L of rhamnose. With a C/N ratio of 100, 1.42g/L of rhamnose was produced. The formation of stable emulsions was better in saline concentrations less than 0.5%, pH in the range of 6 to 9 and temperatures in the range of 35 to 40°C, maintaining about 80% of its original activity for salinity of up to 3% and 120 min of exposure at 100°C.

Key words: Bacteria; Biosurfactant; Submerged fermentation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes microbianos são moléculas anfipáticas, produzidas por ampla variedade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Nos últimos anos, têm recebido atenção especial devido a sua degradabilidade, baixa toxicidade e conseqüente aceitabilidade ecológica. Apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (COSTA et al., 2006).

Os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tensoativos encontram aplicações em panificação e produtos derivados de carnes, onde influenciam as características reológicas da farinha e emulsificação de gorduras. Também são usados na agricultura especialmente em formulação de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. São úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo. Aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos em águas e solos. Emulsificam e dispersam hidrocarbonetos em água aumentando a degradação destes compostos no meio ambiente (NITSCHKE & PASTORE, 2003).

No contexto ambiental, os surfactantes microbianos apresentam vantagens quando comparados aos sintéticos, tais como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, elevada compatibilidade ambiental e capacidade de suportar condições de pH e salinidades extremas (LIMA et al., 2002).

Bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* são conhecidas por produzir surfactantes glicolipídios contendo ramnose e 3-hidroxiácidos graxos. Os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* tem sido amplamente estudados, sendo constituídos por uma mistura de espécies homólogas RL1 (Rha C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>), RL2 (Rha C<sub>10</sub>), RL3 (Rha<sub>2</sub> C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>) e RL4 (Rha<sub>2</sub> C<sub>10</sub>) (COSTA et al., 2006).

A mudança de substratos altera a estrutura dos biossurfactantes e, conseqüentemente, as propriedades emulsificantes, mas estas mudanças podem ser

benéficas quando se deseja propriedades específicas para a aplicação direcionada (COOPER, 1986).

A produção de biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* tem sido estudada a partir de diferentes fontes de carbono: glicerol (SANTA ANNA et al., 2002; ROSERO et al., 2003; RASHEDI et al., 2005), óleos vegetais (LINHARDT et al., 1989; BENINCASA, et al., 2002; COSTA et al., 2006) e hidrocarbonetos (ITOH et al., 1971; WU & JU, 1998; SANTA ANNA et al., 2002; RASHEDI et al., 2005). Também tem sido abordada a influência da fonte de nitrogênio (SANTA ANNA et al., 2002; RASHEDI et al., 2005) e da relação C/N (SANTA ANNA et al., 2002; ROSERO et al., 2003; RASHEDI et al., 2005).

Os biossurfactantes ainda não são amplamente utilizados pela indústria, devido ao seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. Porém o problema econômico da produção de biossurfactante pode ser significativamente reduzido por meio do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Também o uso de novas linhagens microbianas e a compreensão da base fisiológica de produção podem contribuir para o aumento do rendimento e produtividade do processo, tornando-o competitivo frente aos surfactantes sintéticos. Por outro lado, poucas informações são disponíveis a respeito do efeito de fatores como pH, temperatura e salinidade na atividade emulsificante (ILORI et al., 2005).

O litoral sul do Rio Grande do Sul caracteriza-se como ecossistema com peculiaridades interessantes, havendo áreas costeiras sensíveis de circulação restrita, como marismas, lagoas costeiras e praias, com intensa exploração pesqueira. Por outro lado, a intensa atividade industrial e portuária no estuário da Lagoa dos Patos torna a região suscetível a impactos ambientais e presença de diferentes xenobióticos. De amostras de resíduos de pescado capturado nesta região foi isolada a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada neste trabalho.

O presente trabalho teve como objetivo produzir biossurfactante ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de fermentação submersa em frascos agitados, testando diversas fontes de carbono, de nitrogênio, relações C/N e caracterizando o biossurfactante produzido.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi uma cepa bacteriana anteriormente isolada de amostras de resíduos de pescados capturados na região de Rio Grande-RS e identificada no Laboratório de Microbiologia da FURG como *Pseudomonas aeruginosa* (ESSINGER et al., 2004), sendo mantida a 4°C, em Ágar Triptose de Soja (TSA) inclinado.

### 2.2. Reativação da Cultura Estoque

Foram realizados repiques sucessivos em TSA, os quais foram incubados a 35-37°C, por 24-48h, até crescimento vigoroso.

### 2.3. Preparo do Inóculo

Como inóculo, para cada 200mL de meio foram utilizados 4 tubos de cultura microbiana reativada, previamente incubados a 30°C por 48h, em TSA, sendo raspadas com 2mL de água peptonada 0,1% para cada tubo.

### 2.4. Cultivo em Frascos Agitados

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 500mL contendo 200mL de meio, os quais foram incubados em incubadora rotatória a 30°C e 180rpm de agitação, retirando-se alíquotas a cada 24h, sendo estas centrifugadas a 6000rpm por 15min para as determinações analíticas no sobrenadante e sedimento.

A composição do meio sintético base para o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* foi:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,03M),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,04M),  $\text{MgSO}_4$  ( $8,0 \times 10^{-4}\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $7,0 \times 10^{-6}\text{M}$ ),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $4,0 \times 10^{-6}\text{M}$ ), fonte de nitrogênio em estudo (concentração variável) e fonte de carbono em estudo (40g/L). Em todos os experimentos o pH inicial foi ajustado em 6,5.

Os cultivos microbianos foram acompanhados e avaliados pela medida do índice de emulsificação e concentração de ramnolipídios.

### 2.4.1. Influência da fonte de carbono

Foram testadas cinco diferentes fontes de carbono, na concentração de 40g/L: óleo de soja, óleo de pescada, borra de óleo de soja, glicerol e glicose. Em todos os experimentos foi utilizado como fonte de nitrogênio o nitrato de amônio (4,0g/L).

### 2.4.2. Influência da fonte de nitrogênio

Com a fonte de carbono selecionada, foram testadas quatro diferentes fontes de nitrogênio: nitrato de sódio (8,5g/L), nitrato de amônio (4,0g/L), uréia (6,6g/L) e sulfato de amônio (3,0g/L). As concentrações foram estabelecidas de forma a manter a relação C/N em 22.

### 2.4.3. Influência da relação C/N

Com as fontes de carbono e nitrogênio selecionadas foram testadas diferentes relações C/N: 10, 22, 40, 60, 80 e 100, mantendo a concentração da fonte de carbono constante (40g/L) e variando a concentração da fonte de nitrogênio, sendo esta calculada considerando 77,5% de carbono no óleo de soja (PEIXOTO et al., 2005).

## 2.5. Caracterização do Biossurfactante

O biossurfactante obtido de *Pseudomonas aeruginosa* foi caracterizado em termos de estabilidade de emulsões formadas, avaliando-se o efeito da temperatura, pH, salinidade e hidrocarbonetos sobre o índice de emulsificação, determinado de acordo com GAYLARDE (2000). Esta caracterização foi feita de acordo com ILORI et al. (2005).

O efeito da adição de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade do biossurfactante foi investigado pela dissolução de concentração específica de NaCl (0,5-20% p/v).

Para avaliação da influência da temperatura, o biossurfactante foi mantido a uma determinada temperatura constante por 120min, utilizando a faixa de 20-100°C.

Para determinar o efeito do pH na atividade emulsificante, o pH foi ajustado com ácido ou álcali (4-9).

Foram testados diferentes compostos de natureza hidrofóbica na formação de emulsões. Os hidrocarbonetos testados foram: hexano, óleo de soja, óleo de peixe, óleo diesel, petróleo, gasolina, benzeno-tolueno-xileno (BTX), ciclohexano e clorobenzeno.

## 2.6. Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo os resultados analisados por análise de variância e teste de Tukey, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as condições estudadas, a 95% de confiança ( $P \leq 0,05$ ) (MONTGOMERY, 2004).

## 2.7. Determinações Analíticas

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

### 2.7.1. Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (IE) foi determinado de acordo com o proposto por GAYLARDE (2000). A 2mL de sobrenadante adicionou-se 2mL de composto hidrofóbico, agitando-se em vortex durante 2min. Deixou-se em repouso durante 5min, logo após foi medida a altura da camada emulsificada e a altura total da coluna líquida. A medida foi repetida após 24h ( $IE_{24}$ ).

O índice de emulsificação foi calculado como apresentado na Equação (1):

$$IE_{24} = \frac{\text{altura da camada emulsionada}}{\text{altura total}} \times 100$$

Paralelamente, foi feito um ensaio controle, onde a amostra foi constituída pelo meio não fermentado, a fim de avaliar se o próprio meio tinha atividade emulsificante.



### **2.7.2. Determinação de ramnolipídios**

Os ramnolipídios, medidos como ramnose foram determinados através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Em tubo de ensaio foi adicionado 1mL de amostra (sobrenadante) previamente diluída, 1mL de solução de fenol 5% e 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitou-se e deixou-se descansar à temperatura ambiente para leitura de transmitância a 490nm em espectrofotômetro. O meio não fermentado foi utilizado como branco. A curva padrão foi estabelecida para concentrações de ramnose entre 0,02 a 0,2g/L, apresentada em anexo.

### **2.7.3. Determinação da biomassa**

O crescimento bacteriano foi monitorado por medida da absorbância a 600nm baseado no método descrito por WU & JU (1998). Amostras foram retiradas, centrifugadas a 6000rpm por 15min, lavadas, novamente centrifugadas e então ressuspendidas em volume apropriado. A concentração de biomassa foi expressa em peso seco (g/L), obtido a partir de uma curva de calibração, em anexo.

### **2.7.4. Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra (sobrenadante) em um medidor de pH.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Influência da Fonte de Carbono**

A Figura 1 mostra os resultados obtidos para o índice de emulsificação e a concentração de ramnose, ao longo das 96h de fermentação submersa, para as diferentes fontes de carbono testadas, tendo nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

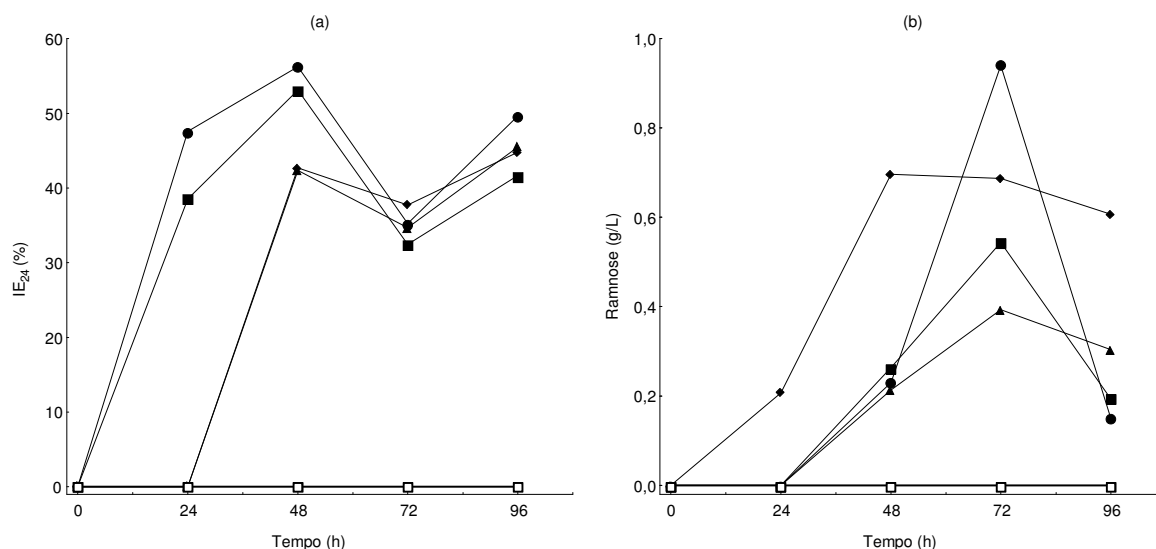


Figura 1: (a) Índice de emulsificação e (b) concentração de ramnose para diferentes fontes de carbono, ao longo do tempo. Os dados apresentados correspondem aos valores médios de 3 experimentos. ● óleo de soja; ■ óleo de peixe; ◆ borra do óleo de soja; ▲ glicerol; □ glicose.

As Figuras 2 e 3 mostram os valores máximos obtidos para o índice de emulsificação e concentração de ramnose, respectivamente. Os valores tabelados encontram-se em anexo. A análise estatística por diferença de médias pelo teste de Tukey mostra que o óleo de soja foi a fonte de carbono mais adequada entre as testadas, pois diferiu significativamente das demais quanto à concentração de ramnose, obtendo-se um índice de emulsificação de 56,4% em 48h e concentração de ramnose de 0,94g/L em 72h.

Também observa-se que não houve produção de biossurfactante na presença de glicose como fonte de carbono, indicando que a produção é induzida pela presença de compostos hidrofóbicos. Fato similar também foi observado por LINHARDT et al. (1989), em que a produção de ramnolipídio foi cerca de 27 vezes maior com óleo de milho, em comparação com a glicose. A função biológica do biossurfactante é permitir a assimilação de hidrocarbonetos dispersos no meio, portanto sua presença induz a produção do biossurfactante, havendo a liberação extracelular do mesmo. No entanto, é mencionada que certas linhagens de *Arthrobacter sp.*, *Bacillus subtilis*, *Torulopsis bombicola* e

*Pseudomonas aeruginosa* produzem biossurfactante a partir de carboidratos (GUERRA – SANTOS et al., 1984), o que caracteriza a produção constitutiva.

As demais fontes demonstraram menor produção, diferindo significativamente entre si quanto à ramnose, no entanto podem constituir fontes potencialmente atrativas, em virtude de disponibilidade e custos. Particularmente a borra de óleo de soja e o glicerol são interessantes em virtude do incentivo governamental à produção de biodiesel, cuja cadeia produtiva gera estes resíduos em quantidades crescentes. Aplicações biotecnológicas destes resíduos tais como biossíntese de ramnolipídios, constituem alternativas com excelentes perspectivas futuras.

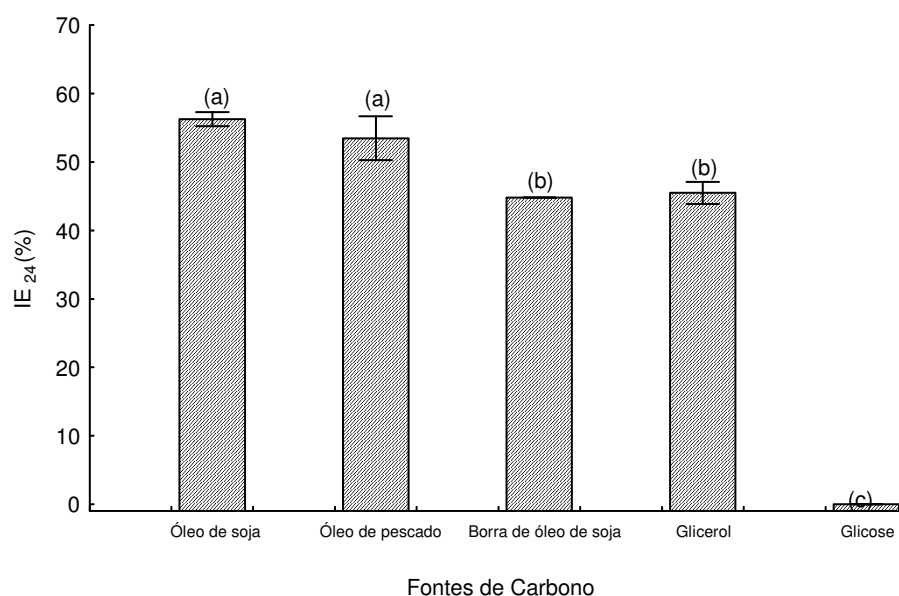


Figura 2: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de carbono, em 48h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

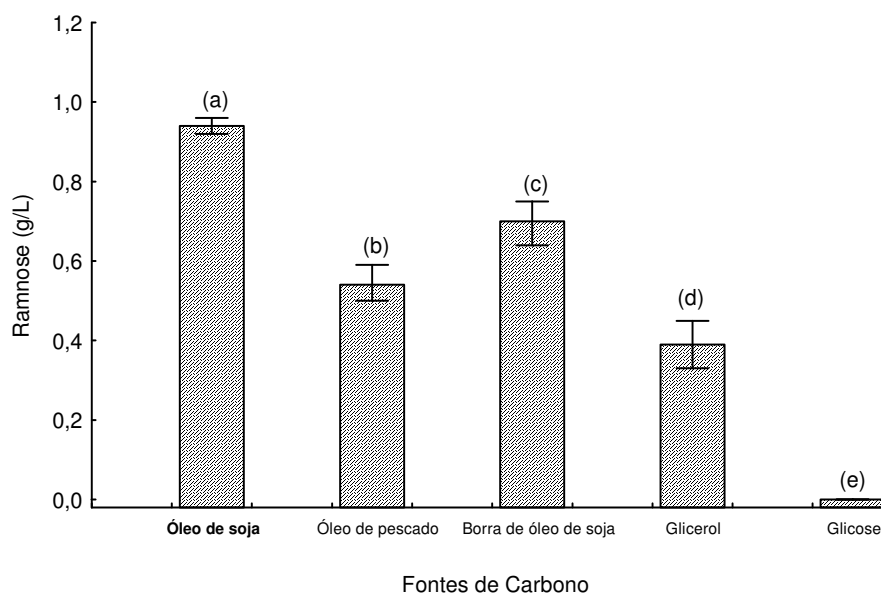


Figura 3: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de carbono, em 72h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

### 3.2. Influência da Fonte de Nitrogênio

A Figura 4 mostra os resultados obtidos para os índices de emulsificação e a concentração de ramnose, ao longo das 96h de fermentação, para as diferentes fontes de nitrogênio testadas, tendo o óleo de soja como fonte de carbono.

As Figuras 5 e 6 mostram os valores máximos obtidos para o índice de emulsificação e concentração de ramnose, respectivamente. Os valores tabelados encontram-se em anexo.

Pelo teste de Tukey foi observado que não houve diferenças significativas entre nitrato de amônio e nitrato de sódio quanto à concentração de ramnose, mas foi observada diferença significativa quanto ao índice de emulsificação, considerando-se, portanto, o nitrato de sódio como a melhor fonte de nitrogênio entre as testadas, obtendo-se índice de emulsificação de 62,1% e concentração de ramnose de 0,94g/L. A uréia e o sulfato de amônio não mostraram-se adequados como fonte de nitrogênio para produção de ramnolipídios.

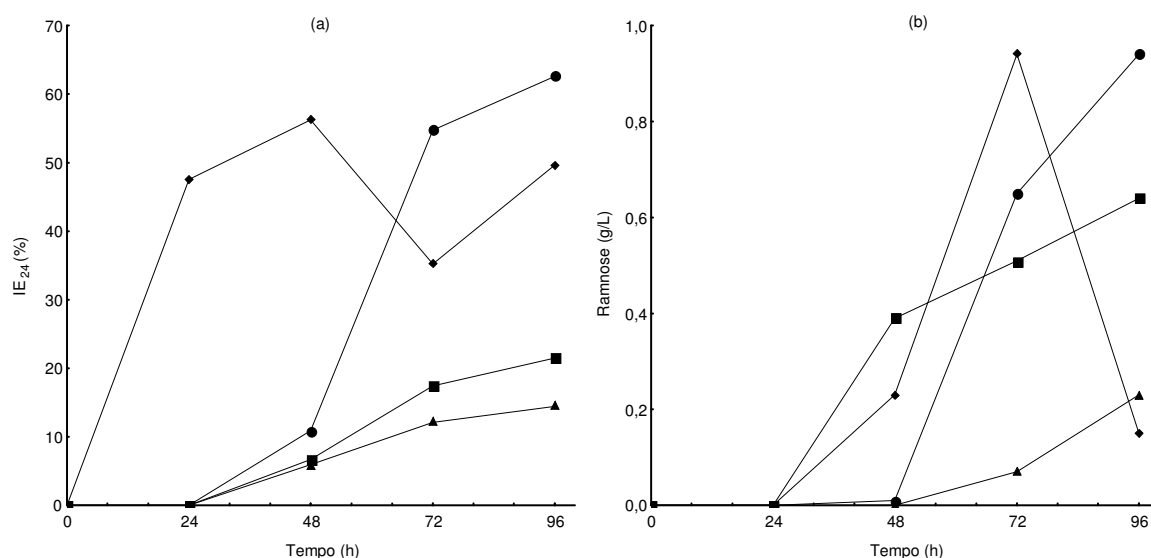


Figura 4: (a) Índice de emulsificação e (b) concentração de ramnose para diferentes fontes de nitrogênio, ao longo do tempo. Os dados apresentados correspondem aos valores médios de 3 experimentos. ◆ nitrato de amônio; ● nitrato de sódio; ■ uréia; ▲ sulfato de amônio.

De acordo com MULLIGAN & GIBBS (1989), bactérias do gênero *Pseudomonas* utilizam nitratos, amônia e aminoácidos como fonte de nitrogênio. O nitrato é reduzido a nitrito e então a amônia. A amônia é então assimilada pela glutamato-desidrogenase (E.C. 1.4.1.4) para formar glutamato ou, com glutamato, pela glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2) para formar glutamina. Glutamina e  $\alpha$ -cetoglutarato são então convertidos a glutamato pela L-glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase (E.C. 1.4.1.13).

Por outro lado, durante a biossíntese do ramnolipídio, a formação da porção lipídica, e não glicídica, é o fator determinante da taxa de produção, sendo que a limitação de nitrogênio promove o acúmulo de lipídios (MULLIGAN & GIBBS, 1989).

Em comparação com a amônia, a assimilação de nitrato é lenta, o que simularia a condição nitrogênio-limitante, favorecendo a produção de ramnolipídios em relação a outras fontes de nitrogênio.

Os resultados estão em concordância com os de SANTA ANNA et al. (2002) e RASHEDI et al. (2005), em que o nitrato de sódio foi mais efetivo que sulfato de amônio e uréia.

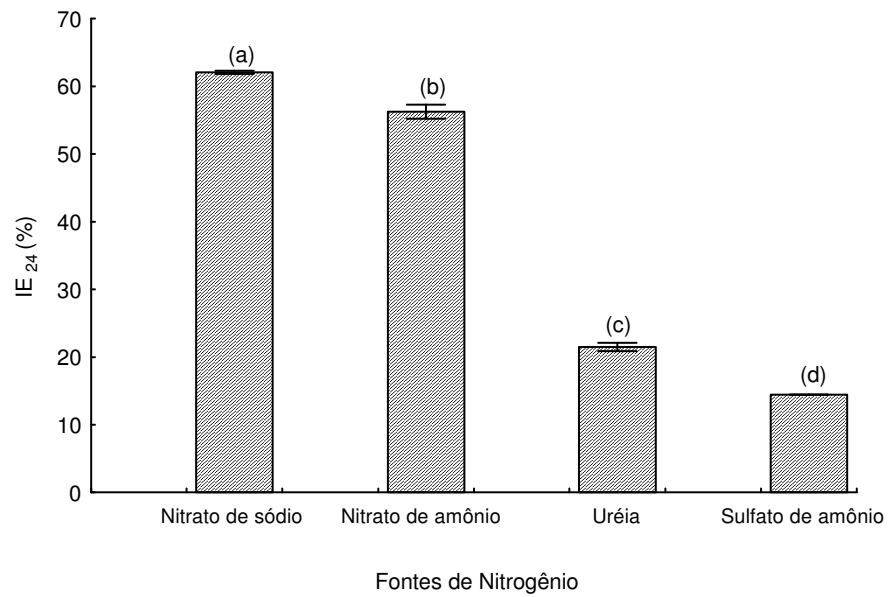


Figura 5: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de nitrogênio, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

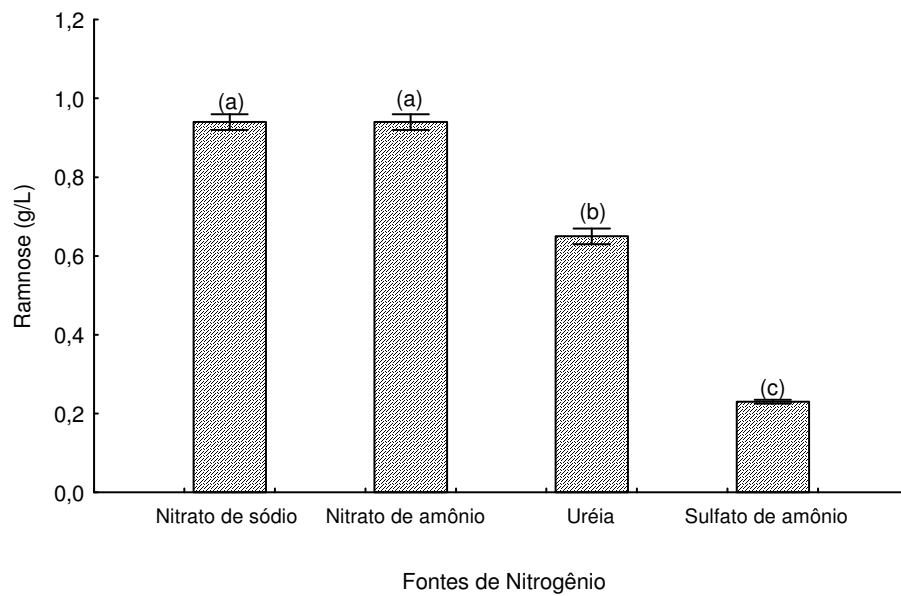


Figura 6: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de nitrogênio, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

### 3.3. Influência da Relação C/N

A Figura 7 mostra os resultados obtidos para o índice de emulsificação e a concentração de ramnose, ao longo das 96h de fermentação, para as diferentes relações C/N testadas, utilizando como fonte de carbono o óleo de soja e fonte de nitrogênio o nitrato de sódio.

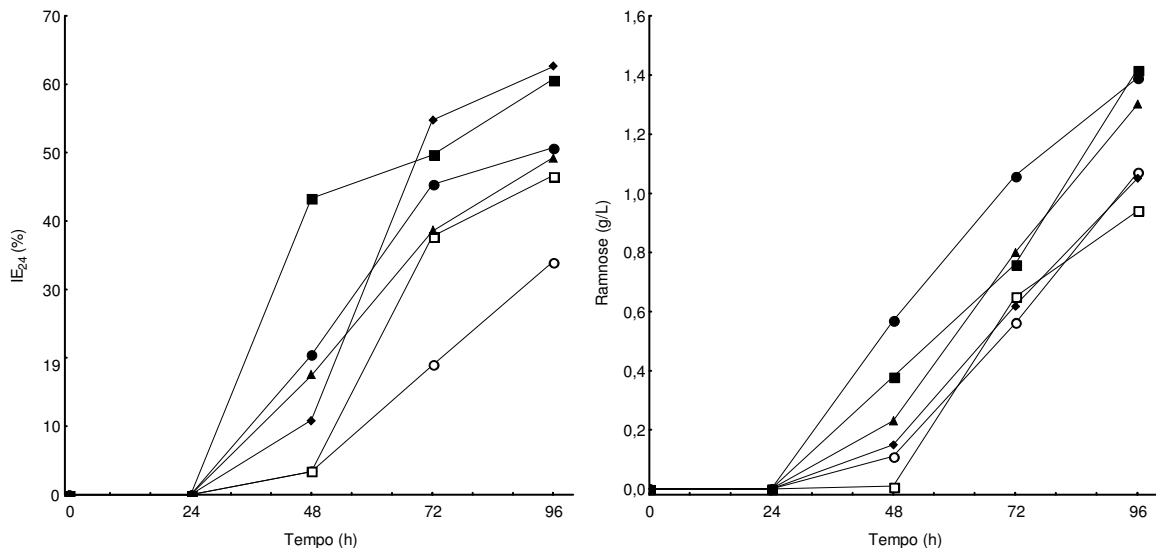


Figura 7: (a) Índice de emulsificação e (b) concentração de ramnose para diferentes relações C/N, ao longo do tempo. Os dados apresentados correspondem aos valores médios de 3 experimentos.

○ C/N 10; ◆ C/N 22; □ C/N 40; ▲ C/N 60; ● C/N 80; ■ C/N 100.

Nas Figuras 8 e 9 são apresentados os valores máximos obtidos, respectivamente, para o índice de emulsificação e concentração de ramnose. Os valores tabelados encontram-se em anexo. Pelo teste de Tukey pode-se observar que a concentração de ramnose foi superior e significativamente diferente para relações C/N maiores que 60, quando comparado com relações C/N entre 10 e 40. Não houve diferenças significativas em relação à ramnose para as relações C/N 60, 80 e 100, no entanto com a relação C/N 100 o índice de emulsificação foi diferente dos demais. Portanto, foi selecionada a relação C/N 100, com a qual foi obtido índice de emulsificação de 60,7% e concentração de ramnose de 1,42g/L, o que representa um aumento de aproximadamente 50% na concentração de ramnose em relação a C/N original.

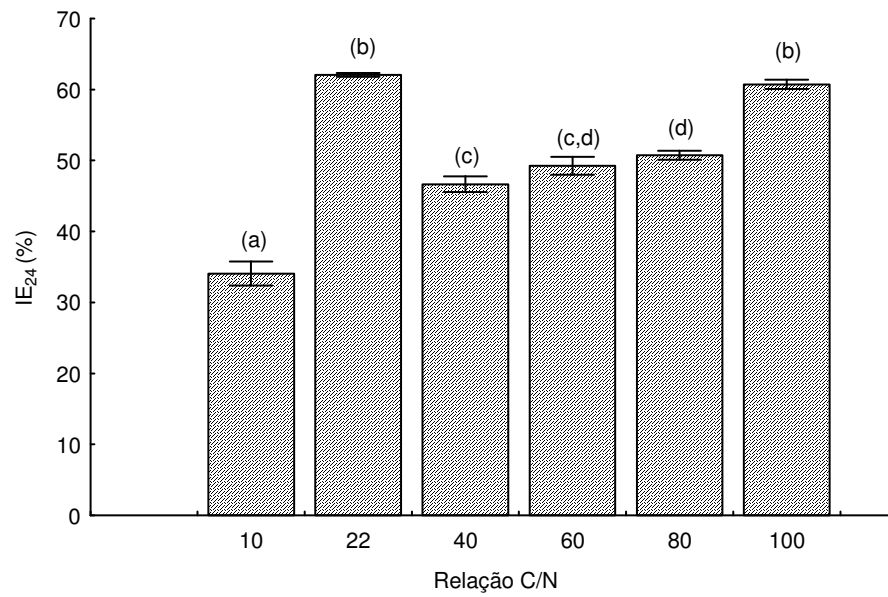


Figura 8: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes relações C/N, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

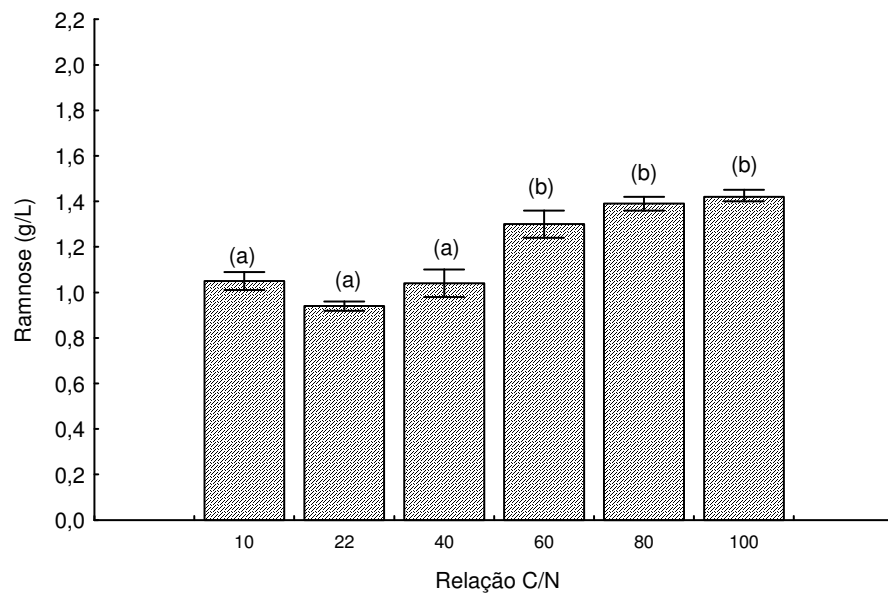


Figura 9: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes relações C/N, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.



GUERRA – SANTOS et al. (1984) observaram que em meio contendo nitrato de sódio ou amônia, com extrato de levedura, o crescimento celular foi favorecido em detrimento da produção do biossurfactante. Já sem o extrato de levedura o crescimento celular foi menor, resultando em glicose residual, mas com maior produção de biossurfactante, um indicativo de meio nitrogênio limitante.

A condição nitrogênio-limitante foi considerada por diversos autores como favorável à produção de ramnolipídios. SANTA ANNA et al. (2002), ROSERO et al. (2003) e RASHEDI et al. (2005) comentam que limitações nutricionais direcionam o metabolismo à formação do biossurfactante. Estabeleceram como melhor relação C/N, respectivamente, 60, 40 e 55.

Para relação C/N 100, foram realizados ensaios em triplicata, visando correlacionar a formação de ramnolipídios e o crescimento microbiano. A Figura 10 mostra os resultados obtidos.

De acordo com a Figura 10, a produção de ramnolipídios começa a ser observada após 48h de crescimento celular intensificando-se após 72h, podendo este comportamento estar associado, segundo alguns autores (ROSETO et al., 2003 e BENINCASA et al., 2002) ao esgotamento de nitrogênio.

Por outro lado, o mecanismo denominado sensor de quorum (*quorum sensing*) é caracterizado pela produção de compostos difusíveis chamados autoindutores, os quais, em elevadas densidades bacterianas, interagem e ativam reguladores transcricionais específicos (MAIER & SOBERÓN – CHAVES, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* contém dois destes sistemas, *las* e *rhh*, este último relacionado à expressão da enzima ramnosiltransferase, que catalisa a transferência de ramnose de TDP-L-ramnose a  $\beta$ -hidroxialcanoato para síntese do ramnolipídio (CHEN et al., 2005).

A produção de ramnolipídios (1,42g/L, expresso em ramnose) foi considerada promissora, mas a otimização das condições de cultura pode levar a um aumento no rendimento e produtividade. WU & JU (1998), SANTA ANNA et al. (2002) e RASHEDI et al. (2005) obtiveram, respectivamente, 1,0g/L, 3,16g/L e 2,8g/L.

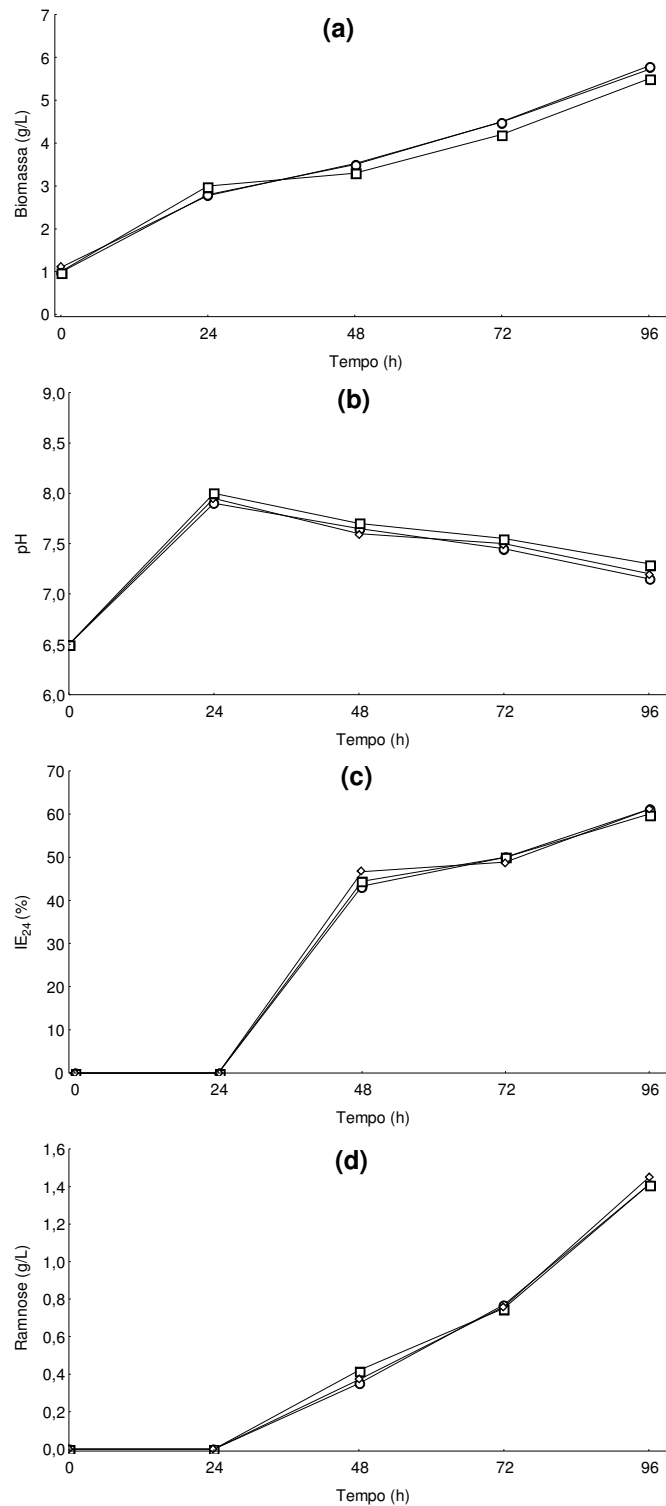


Figura 10: Acompanhamento do processo fermentativo utilizando 40g/L de óleo de soja, 1,88g/L de nitrato de sódio e relação C/N 100. (a) Biomassa, (b) pH, (c) índice de emulsificação e (d) concentração de rarnnose.

### 3.4. Caracterização do Biossurfactante

As Figuras 11 a 14 mostram como a formação de emulsões foi influenciada, respectivamente, pela salinidade, pH, temperatura e hidrocarbonetos.

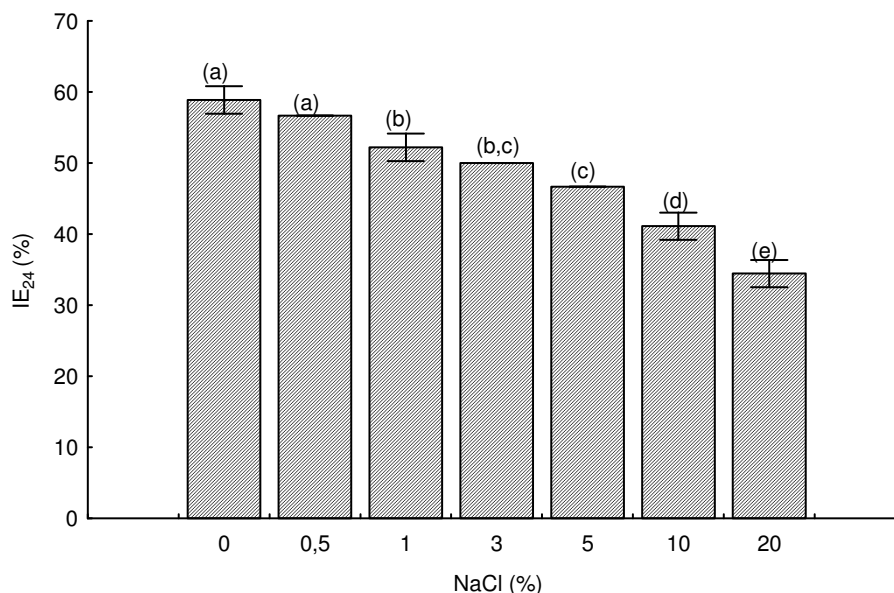


Figura 11: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes concentrações salinas, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

Quanto à concentração salina (Figura 11), as melhores emulsões foram formadas em baixas concentrações salinas (de até 0,5%). No entanto, 80% da capacidade emulsificante permaneceu em concentrações de até 3%, valor próximo à salinidade da água do mar.

Na Figura 12, pode-se observar que não houve formação de emulsão nos pHs 4,0 e 5,0, e não houve diferença significativa entre os pHs 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0. O biossurfactante ramnolípido em estudo mostra, portanto, excelente habilidade e estabilidade na formação de emulsão em meio neutro e alcalino.

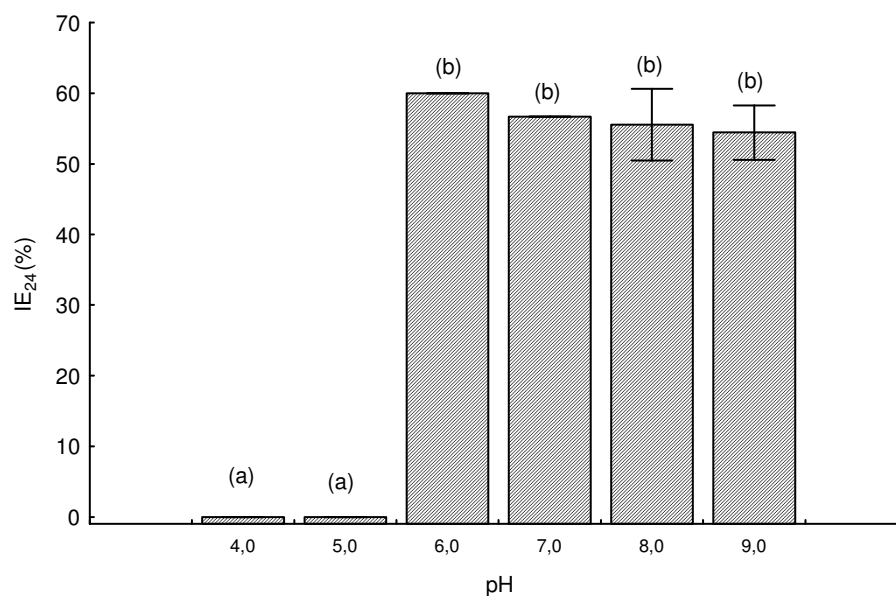


Figura 12: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes pH, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

Tais comportamentos podem estar associados ao fato de que a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* em estudo é proveniente de ambiente costeiro, que apresenta estas peculiaridades. Desta forma, com tais características o biossurfactante ramnolípido produzido mostra habilidade para a biorremediação em ambientes marinhos e estuarinos em que condições neutras e/ou alcalinas e presença de sais são encontradas.

Na Figura 13 observa-se melhor desempenho na formação de emulsões nas temperaturas de 35 e 40°C, sendo que cerca de 80% da capacidade emulsificante foi mantida mesmo após 120min de tratamento térmico a 100°C. Isto mostra excelente estabilidade térmica do biossurfactante, permitindo seu uso na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, em que as operações de aquecimento/esterilização são importantes.

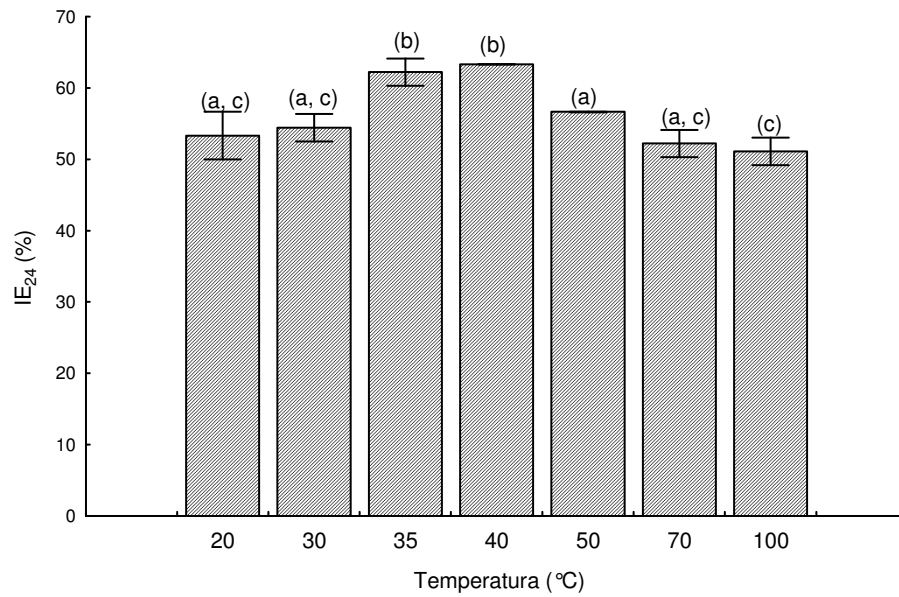


Figura 13: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes temperaturas, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

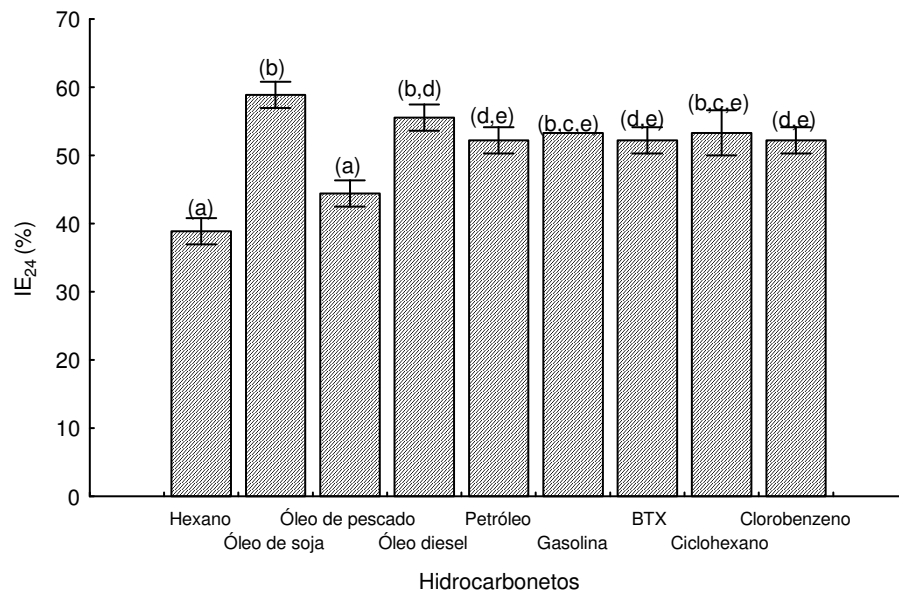


Figura 14: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes hidrocarbonetos, em 96h. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

De acordo com a Figura 14, emulsões podem ser formadas com diversos compostos hidrofóbicos de natureza distinta, uma importante propriedade para aplicações ambientais. Óleo de soja, óleo diesel, gasolina e ciclohexano foram bons substratos para a emulsificação pelo biossurfactante, sem diferenças significativas entre si. Petróleo, BTX e clorobenzeno também formaram emulsões estáveis. N-hexano e óleo de pescado foram diferentes dos demais, resultando fraca emulsificação.

#### 4. CONCLUSÕES

- *Pseudomonas aeruginosa* isolada de ambiente costeiro do sul do Brasil apresentou potencial para produção de biossurfactante ramnolipídio.
- O microrganismo mostrou habilidade de produzir biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono alternativas, disponíveis regionalmente, com melhores resultados para o óleo de soja.
- Nitrogênio suprido na forma de nitrato favoreceu a produção de ramnolipídios obtendo-se, com óleo de soja e relação C/N 22, 0,94g/L de ramnose e índice de emulsificação de 62,1%.
- A condição nitrogênio-limitante favoreceu a produção de ramnolipídios, obtendo-se, para a relação C/N 100, 1,42g/L de ramnose, um aumento de aproximadamente 50%.
- O extrato contendo ramnolipídios foi capaz de formar emulsões estáveis com diferentes hidrocarbonetos, bem como estabilidade na presença de sais e em pH neutro a alcalino, sugerindo grande potencial para o tratamento de poluição ambiental marinha e estuarina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA M.A; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, n. 54, p. 283-288, 2002.

- CHEN, C.C.; RIADI, L.; SUH, S.J.; OHMAN, D.E.; JU, L.K. Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation. *Journal of Biotechnology*, v. 117, p. 1-10, 2005.
- COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.
- COSTA, S.G.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, N.M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.
- DUBOIS, M.K.A.; GILLES, J.K.; HAMILTON, P.A.; SMITH, R.F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ESSINGER D.; SGANZERLA J.; SANZO A.V.L.; BURKERT J. F. M.; KALIL S. J. Seleção de microrganismos produtores de lipase. **Anais do II Encontro de Qualidade de Alimentos e Ambiente**, Rio Grande-RS, outubro de 2004.
- GAYLARDE, C. Seleção de microrganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção. In: Silva, C. M. M. S.; Roque, M. R. A.; Melo, I. S. **Microbiologia Ambiental: manual de laboratório**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 98 p.
- GUERRA – SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.
- ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.
- ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. **The Journal of Antibiotics**, v. 12, p. 855-859, 1971.
- LIMA, L.A.K.C.; MACEDO, G.R.; MAGALHÃES, M.M.A.; BEZERRA, M.S.; ALMEIDA, D.V.; COSTA, A.S.S. Estudo cinético da produção de biosurfactante. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Natal-RN, setembro de 2002.

- LINHARDT, R. J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1989.
- MAIER, R.M., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.54, p. 625-633, 2000.
- MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4º Edição. Editora LTC. Rio de Janeiro. 2004.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 11, 1989.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- PEIXOTO, E.C.D.; RODRIGUES, C.E.C.; MEIRELLES, A.J.A. Estudo do equilíbrio líquido-líquido do sistema óleo de soja refinado/ ácido linoléico comercial/ etanol hidratado, à 25°C. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Campinas-SP, 2005.
- RASHEDI, H.; JAMSHIDI, E.; ASSADI, M.M.; BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2005.
- RIBEIRO, F.; SANZO, A.V.L.; KALIL,S.J.; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Isolamento de microrganismos degradadores de poluentes oriundos da indústria do petróleo. **Anais do I Simpósio Tendências e Perspectivas da Oleoquímica e da petroquímica**, 20 a 22 de novembro de 2002, Rio Grande-RS.
- ROSETO, N.G.; PIMIENTA, A.L.; DUGARTE, F.; CARVAJAL, F.G. Parameters examination of a biosurfactant production at laboratory scale. **Ciência, Tecnología y Futuro**, v. 2, n. 4, 2003.
- SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas*



*aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

WU, J.; JU, L. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p.193-202,1998.

**ARTIGO 2**

**BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM SOLO POR DIFERENTES TÉCNICAS  
DE BIOESTIMULAÇÃO**

## BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM SOLO POR DIFERENTES TÉCNICAS DE BIOESTIMULAÇÃO

### RESUMO

Com o maior consumo de petróleo e derivados, cresceu a exposição de ambientes a possíveis acidentes relacionados à produção, transporte, carga e descarga desses materiais, sendo cada vez mais necessário buscarem-se alternativas tecnológicas para a recuperação desses ambientes. A biorremediação pode ser definida como o uso das potencialidades dos microrganismos em degradar compostos poluentes, reduzindo o grau de contaminação ou mesmo descontaminando ambientes degradados. Entre as técnicas disponíveis, a bioestimulação é uma das mais usadas, em que a microbiota nativa é estimulada pela adição de nutrientes e coadjuvantes como surfactantes. O presente trabalho buscou avaliar a degradação do petróleo em solo retirado de local próximo a um oleoduto na região de Rio Grande-RS, sul do Brasil, por diferentes técnicas de bioestimulação. O biosurfactante tipo rhamnolípido utilizado foi produzido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* isolada na região, e o monitoramento dos tratamentos foi realizado através da contagem de bactérias mesófilas, bolores e leveduras, determinação de pH e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos com adição de nutrientes e adição de nutrientes mais biosurfactante, com 90,4% e 80,9% de remoção de HTP, respectivamente, demonstrando efetiva melhoria em relação ao controle (42,2%), havendo uma clara relação entre a dinâmica da microbiota nativa e a biodegradação.

Palavras-chave: Biosurfactante; Biorremediação; Hidrocarbonetos.

---

## BIODEGRADATION OF PETROLEUM IN SOIL BY DIFFERENT BIOSTIMULATION TECHNIQUES

### ABSTRACT

With the huge consumption of petroleum and its derivatives, the exposure of environments to possible accidents related to the production, transport, loading and unloading of these materials has increased, making it necessary to search for technological alternatives in the recovery of these environments. Bioremediation can be defined as the use of the potential of microorganisms in degrading pollutant compounds, reducing the degree of their contamination or decontaminating degraded environments. Among the available techniques, biostimulation is one of most commonly used, where native microbiota is stimulated by the addition of nutrients and amendments as surfactants. The present work aimed at evaluating the degradation of crude oil in soil removed from a site next to a pipe-line in the region of Rio Grande-RS, southern Brazil, by different biostimulation techniques. The rhamnolipid biosurfactant used was produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated in this geographic area, and the monitoring of the treatments was carried out by the counting of mesophiles bacteria, moulds and yeasts, determination of pH and total petroleum hydrocarbons (TPH). The best results were obtained in the treatments with addition of nutrients and addition of nutrients and biosurfactant, with 90.4% and 80.9% HTP removal, respectively, demonstrating effective improvement in relation to the control (42.2%), having a clear relation between the dynamics of native microbiota and the biodegradation.

Key words: Biosurfactant; Bioremediation; Hydrocarbons.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm crescido a preocupação com o meio ambiente, em especial com os impactos decorrentes de derrames de petróleo e derivados. Um dos melhores procedimentos para recuperar solos contaminados é aproveitar o potencial fisiológico de microrganismos já presentes no solo e capazes de degradar compostos tóxicos, sendo este processo conhecido como bioestimulação (BENTO et al., 2005).

O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos em um sistema contaminado, o que causa o aumento da população de microrganismos nativos. Os microrganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de carbono. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação do número de microrganismos causado pelo aumento dos níveis de nutrientes (SARKAR et al., 2005).

A bioestimulação, quando comparada a outros procedimentos de recuperação ambiental, apresenta como vantagens menor custo, maior segurança e menor interferência no meio ambiente (GHAZALI, 2001). Esta tecnologia acelera a biodegradação natural, podendo-se otimizar condições como suplemento de oxigênio, conteúdo de água, temperatura, pH, adição de nutrientes e outros compostos coadjuvantes (TRINDADE et al., 2005).

Alguns compostos do petróleo são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na natureza, sendo necessário facilitar a assimilação destas moléculas pelos microrganismos. Geralmente, somente a fração de hidrocarbonetos dissolvidos na forma aquosa está disponível para a degradação biológica, enquanto que a fração adsorvida tem menor disponibilidade (TRINDADE et al., 2005). Surfactantes são compostos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, aumentando a biodisponibilidade do contaminante (BENINCASA et al., 2002).

Surfactantes produzidos biologicamente nos últimos anos têm recebido atenção especial devido a sua degradabilidade, baixa toxicidade e conseqüente aceitabilidade ecológica, além de apresentarem a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de

substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (CAMEOTRA & BOLLAG, 2003).

Os biossurfactantes são utilizados industrialmente como adesivos, floculantes, agentes umectantes e espumantes, de-emulsificadores e penetrantes. São utilizados para estas aplicações baseados em sua habilidade de reduzir as tensões superficiais, de aumentar a solubilidade, pelo poder detergente, habilidade umectante e capacidade espumante. A indústria de petróleo é, tradicionalmente, a maior usuária, para remoção melhorada de óleo e biorremediação (MULLIGAN, 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* é reconhecida por sua habilidade de produzir biossurfactante do tipo ramnolipídio a partir de diferentes substratos (BENINCASA et al., 2002; SANTA ANNA et al., 2002; ROSERO et al., 2003; RASHEDI et al., 2005; COSTA et al., 2006; BALBUENA et al., 2006). No entanto, estudos que envolvem sua aplicação em processos de biorremediação têm sido ainda pouco explorados (RAHMAN et al., 2002; RAHMAN et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo aplicar diferentes técnicas de bioestimulação, com e sem adição de biossurfactante ramnolipídio, na biorremediação de solo arenoso contaminado com petróleo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Produção do Biossurfactante**

O microrganismo utilizado foi uma cepa bacteriana anteriormente isolada na região de Rio Grande-RS e identificada no Laboratório de Microbiologia da FURG como *Pseudomonas aeruginosa* (ESSINGER et al., 2004). O microrganismo foi mantido a 4°C, em tubos inclinados contendo Ágar Triptose de Soja (TSA).

A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio sintético, com a seguinte composição:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,05M),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,03M),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (0,04M),  $\text{MgSO}_4$ , ( $8,0 \times 10^{-4}$ M),  $\text{CaCl}_2$ , ( $7,0 \times 10^{-6}$ M),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $4,0 \times 10^{-6}$ M) e óleo de soja (40g/L).

Como inóculo, para cada frasco foram utilizados 4 tubos de cultura microbiana previamente incubados a 30°C por 48h, em TSA, sendo raspadas com 2 mL de água peptonada 0,1%. Os erlenmeyers foram dispostos em incubadora rotatória a 30°C e 180 rpm por 48h, após o meio fermentado foi centrifugado a 6000rpm por 15min, descartando-se o sedimento, obtendo extrato contendo biossurfactante ramnolipídio.

## 2.2. Ensaio de Bioestimulação em Solo

Para acompanhar o comportamento dos tratamentos, em uma primeira etapa (janeiro a julho de 2006) foram montados experimentos onde foi simulado um derrame de petróleo, utilizando para isso cinco caixas de vidro com dimensões de 28,5x28,5x10cm assim denominados: controle do solo, sem adição de petróleo (A), controle do petróleo, sem bioestimulação (B), bioestimulação com nutrientes (C), bioestimulação com biossurfactante não-estéril (D) e bioestimulação com nutrientes mais biossurfactante não-estéril (E). De cada caixa foi coletada uma amostra de solo, em um único ponto aleatório, para cada tempo de coleta.

Em uma segunda etapa (julho a dezembro de 2006), quatro experimentos distintos foram conduzidos, a fim de verificar se a presença de *Pseudomonas aeruginosa* contribuía no processo degradativo, e assim denominados: controle do solo (F), controle do petróleo, sem bioestimulação (G), tratamento com biossurfactante estéril e nutrientes (H) e tratamento com biossurfactante não-estéril e nutrientes (I). Algumas mudanças em relação à primeira etapa foram implementadas. A adição do biossurfactante estéril e não-estéril foi realizada após 24h. Em cada caixa a amostra de solo foi coletada em 3 pontos distintos e homogeneizada, para cada tempo de coleta.

Os experimentos foram montados e conduzidos no Laboratório de Oceanografia Geológica da FURG. Os derrames foram feitos na proporção de 4% (p/p) de petróleo, sendo adicionados nutrientes na relação C:N:P de 100:1,25:1 (TRINDADE et al., 2005), e o extrato contendo o ramnolipídio na relação extrato:petróleo de 1:1 (v/v).

As amostragens foram realizadas nos seguintes períodos: 0, 2, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, na primeira etapa; e 0, 1, 2, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, na segunda etapa. As amostras para determinação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

(HTP) foram secas ao ar, após foram desagregadas e acondicionadas em frascos de vidro. As amostras para análises microbiológicas foram coletadas em frascos esterilizados e processadas no mesmo dia.

### **2.3. Determinações Analíticas**

#### **2.3.1. Determinação de pH**

As medidas de potencial hidrogeniônico (pH) foram realizadas conforme TEDESCO et al. (1995), em que foi adicionada água às amostras, na proporção de 10:25, e a leitura feita em medidor de pH digital.

#### **2.3.2. Determinação de umidade**

A umidade das amostras foi determinada segundo a metodologia AOAC (1995), baseada na perda de peso após a secagem em estufa a 105°C até peso constante.

#### **2.3.3. Determinação da temperatura**

A temperatura ambiente foi monitorada com termômetro digital.

#### **2.3.4. Determinação de hidrocarbonetos**

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram determinados pelo método gravimétrico, segundo WEISMAN (1998). As amostras foram extraídas por ultra-som utilizando hexano como solvente, o extrato foi transferido para um balão devidamente limpo e previamente pesado, após o solvente foi evaporado em evaporador rotativo e seco com fluxo de nitrogênio, sendo que o resultado foi calculado por gravimetria. As determinações foram feitas em duplicata, sendo realizadas pelo Laboratório de Oceanografia Geológica da FURG.

### **2.3.5. Contagem de bactérias mesófilas**

As bactérias foram inoculadas em profundidade, em placas de Petri, com Agar Plate Count, em duplicata, incubadas por 48h a 35-37°C, e após foi realizada a contagem nas placas que continham entre 25 e 250 colônias (RAHMAN et al., 2002).

### **2.3.6. Contagem de bolores e leveduras**

Os fungos foram inoculados por espalhamento em superfície, em placas de Petri, com Ágar Batata Dextrose, em duplicata, incubadas por 3-5 dias a 25°C, e após foi realizada a contagem nas placas que continham entre 15 e 150 colônias (RAHMAN et al., 2002).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Primeira Etapa**

#### **3.1.1. Monitoramento do pH, temperatura e umidade**

Na Figura 1 estão expressos os valores do pH, no decorrer dos 180 dias. Como durante os experimentos o pH variou entre 6-8, apresentando assim um caráter neutro a básico, possibilitou a ação dos microrganismos presentes no solo, favorecendo a biodegradação. O monitoramento do pH do solo é importante, pois segundo DIBBLE & BARTHA (1979) a biodegradação ocorre com maior eficiência na faixa de pH 7,5 a 7,8.

Durante os 180 dias de experimento, as caixas foram mantidas a uma umidade entre 65-80% da capacidade de campo conforme SARKAR et al. (2005), a temperatura oscilou entre 10 e 34°C.



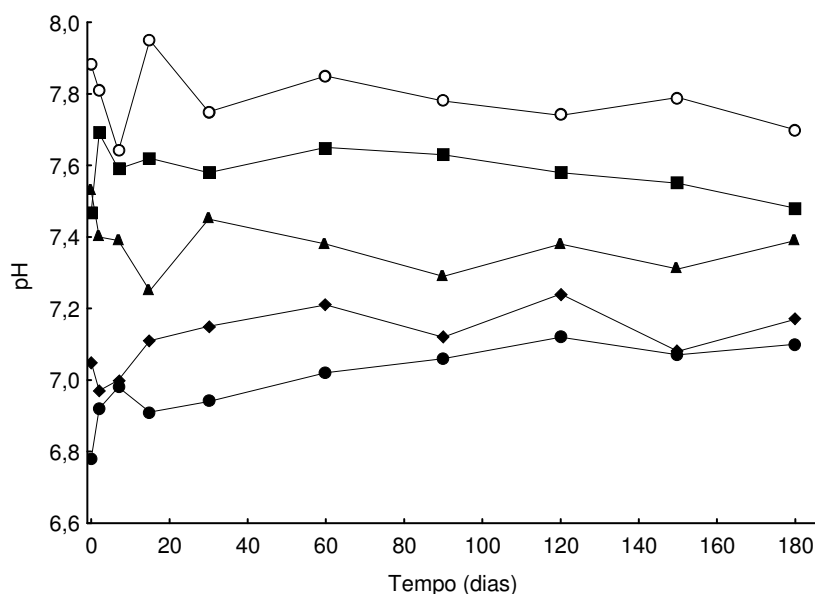


Figura 1: Acompanhamento do pH.

O A (solo); ■ B (solo+petróleo); ◆ C (solo+petróleo+nutrientes); ▲ D (solo+petróleo+biossurfactante); ● E (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante).

### 3.1.2. Dinâmica da microbiota nativa

A Figura 2 apresenta a contagem de bactérias, bolores e leveduras ao longo dos 180 dias para os 5 ensaios realizados. Os resultados tabelados encontram-se em anexo.

Comparando-se as Figuras 2 (a) e 2 (b) observa-se uma variação mais pronunciada na população bacteriana.

Em um ambiente contaminado, os hidrocarbonetos são, geralmente, degradados por bactérias, havendo também a possibilidade de atuação de fungos neste processo. Porém, a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo (CUNHA, 1996). Desta forma, os fungos são considerados mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade. E as bactérias são mais eficientes em condições normais como o pH na faixa da neutralidade, caso dos ensaios realizados.

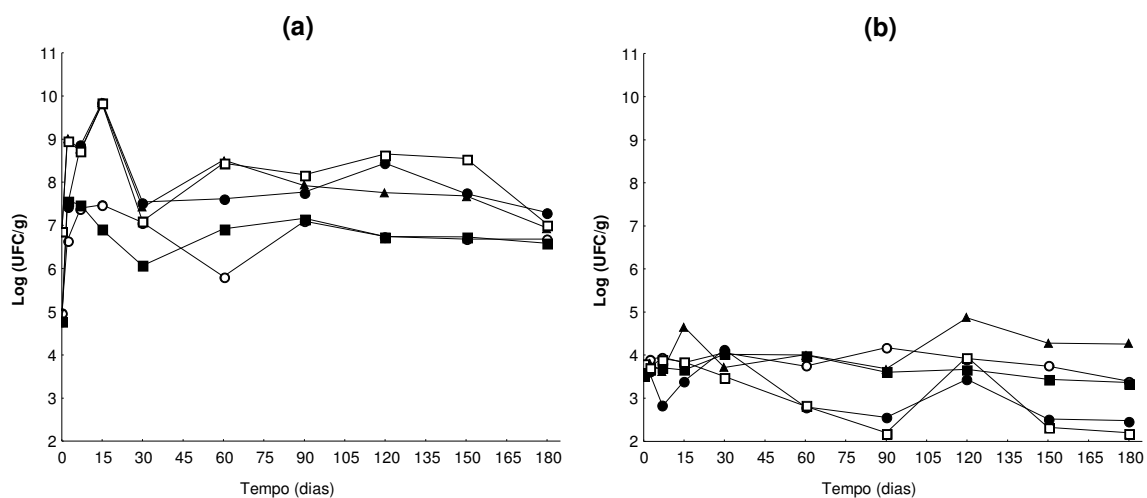


Figura 2: (a) Contagem de bactérias mesófilas e (b) contagem de bolores e leveduras.

○ A (solo); ■ B (solo+petróleo); ● C (solo+petróleo+nutrientes); ▲ D (solo+petróleo+biossurfactante); □ E (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante).

As caixas D e E iniciaram com contagens de bactérias mais elevadas em função, provavelmente, da presença de *Pseudomonas aeruginosa* no extrato contendo o biossurfactante, já que o mesmo foi utilizado não-estéril. Inclusive foi observada a formação de colônias de coloração típica verde de *Pseudomonas aeruginosa*.

Nas caixas C, D e E, respectivamente, nutrientes, biossurfactante, biossurfactante e nutrientes, observou-se aumentos expressivos da população bacteriana nos primeiros 15 dias, atingindo níveis máximos de  $7,20 \times 10^9$ ,  $6,75 \times 10^9$  e  $6,60 \times 10^9$  UFC/g, respectivamente. O aumento mais pronunciado foi na caixa C. Tais fatos podem ser explicados pela adição dos nutrientes e/ou biossurfactante (cujo extrato contém também nutrientes).

A partir do 30º dia houve tendência à redução e estabilização da população bacteriana, pelo provável decréscimo de nutrientes, incluindo a própria fonte de carbono principal, o petróleo, que foi em parte degradado. As oscilações observadas podem ser indicativo de mudanças na biodiversidade da microbiota, com a predominância de organismos hidrocarbonocásticos (BENTO et al, 2005).

Quanto aos fungos, não foram observadas variações pronunciadas ao longo dos experimentos, obtendo-se apenas uma tendência à redução nas caixas C e E (ambas com nutrientes) e de aumento na caixa D ao final do processo.

Através de microcultivos, realizados em todos os tempos de coleta, foram observados com maior frequência os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*.

### 3.1.3. Biodegradação de petróleo

As Figuras 3 e 4 mostram a biodegradação de petróleo observada nos quatro diferentes tratamentos do solo contaminado. Os dados foram fornecidos por SILVA e colaboradores (2007), referentes à sua dissertação de mestrado (dados não publicados nesta data).

Como pode ser observado na Figura 3, a degradação dos hidrocarbonetos em solos mostra uma rápida fase inicial seguido por um período de lenta mudança na concentração, o que de acordo com SABATÉ et al. (2004) está associada ao esgotamento de nutrientes, população microbiana descendente, menor biodisponibilidade e maior recalcitrância de contaminantes. A rápida redução inicial também pode estar associada aos processos naturais de intemperização, com perda das frações mais voláteis. Convém ressaltar que as temperaturas registradas neste período inicial foram elevadas, compreendendo o período de verão, o que pode ter favorecido o processo.

Observa-se um claro aumento do percentual de biodegradação de petróleo com os tratamentos quando comparado à atenuação natural (ensaio B), conseguindo-se elevá-lo de 42,2% até 90,4% (Figura 4). Este resultado pode ser considerado bastante satisfatório, já que SABATÉ et al (2004) observaram reduções de 61% e 60%, com o uso de nutrientes e nutrientes com surfactante Tween 80, ao realizarem bioestimulação em solo arenoso contaminado com 20,970mg HTP/Kg. RAHMAN et al (2002) conseguiram degradar 78% dos hidrocarbonetos em 60 dias utilizando um aditivo contendo biosurfactante ramnolipídio.

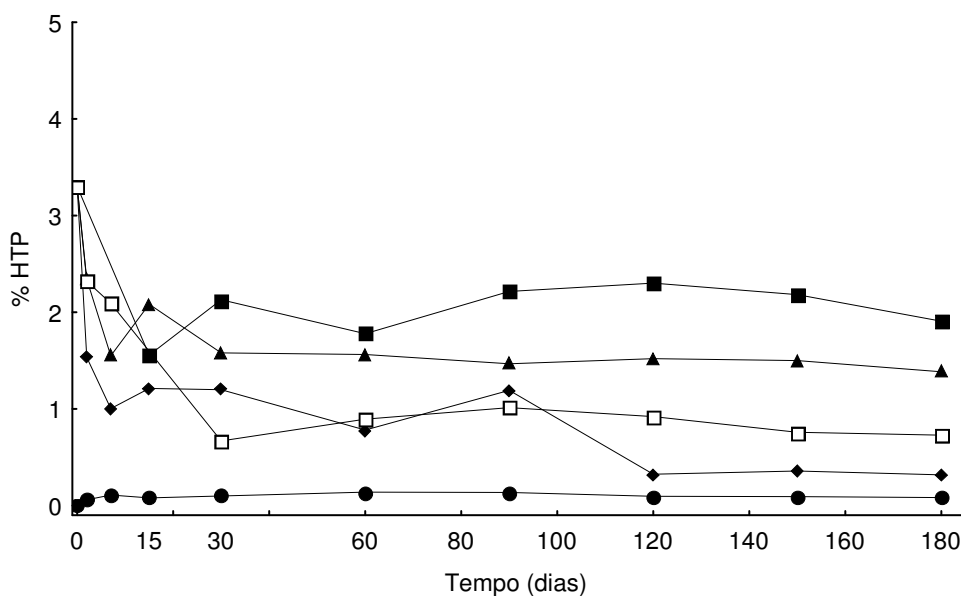


Figura 3: Acompanhamento da degradação de HTP.

● A (solo); ■ B (solo+petróleo); ◆ C (solo+petróleo+nutrientes); ▲ D (solo+petróleo+biossurfactante); □ E (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante).

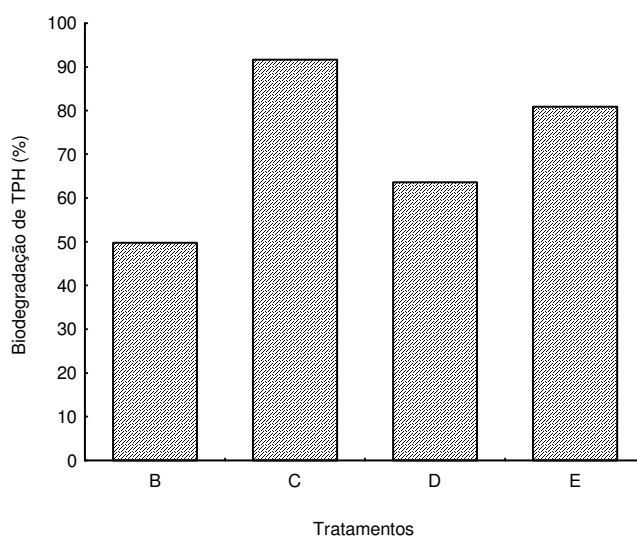


Figura 4: Percentual de biodegradação de petróleo em solo contaminado, em 180 dias.

B=solo+petróleo; C=solo+petróleo+nutrientes; D=solo+petróleo+biossurfactante; E=solo+petróleo+nutrientes+ biossurfactante.

Nos tratamentos contendo nutrientes foram observados os maiores percentuais de degradação de petróleo: o tratamento C apresentou 90,4% de petróleo degradado, o

tratamento E apresentou 80,9%. O tratamento D, somente biossurfactante, apresentou um percentual de 58,1% de degradação. A influência da adição de nutrientes mostrou-se extremamente relevante, pois possibilitou a criação de um ambiente ideal à biodegradação. Embora o petróleo seja uma fonte de carbono para os microrganismos, não fornece nutrientes como fósforo e nitrogênio, que também são necessários. A falta destes nutrientes determina a redução da taxa de degradação (NAS, 1985). O fato da caixa contendo somente biossurfactante (D) ter ocorrido menor degradação indica que o extrato, apesar de favorecer a degradação quando comparado à condição B (somente petróleo), não supre as necessidades nutricionais dos microrganismos degradadores.

Por outro lado, a diferença observada entre as caixas C e E não foi conclusiva, pois não foram realizadas réplicas dos experimentos. Além disso, a presença do biossurfactante pode interferir na análise de HTP, pois em função da sua capacidade emulsificante pode aumentar a extração de hidrocarbonetos (SABATÉ et al., 2004).

Procurando correlacionar a degradação do petróleo com o crescimento bacteriano, pode-se observar na Figura 3 que nos experimentos C, D e E o nível de degradação é similar aos 90 dias de tratamento. A partir deste ponto, a degradação torna-se mais eficiente nos ensaios C e E, em que há presença de nutrientes, o que estaria favorecendo a manutenção da microbiota e conseqüente degradação mais eficiente das frações recalcitrantes do petróleo. Tal afirmação confirma-se pela análise da Figura 1, em que verifica-se que nas caixas C e E, a partir de 90 dias, o número de microrganismos permaneceu em patamares mais elevados.

## **3.2. Segunda Etapa**

### **3.2.1. Monitoramento do pH, temperatura e umidade**

Durante os experimentos o pH variou entre 6-8, apresentando assim um caráter neutro a básico (Figura 5), similar ao observado na primeira etapa de experimento.

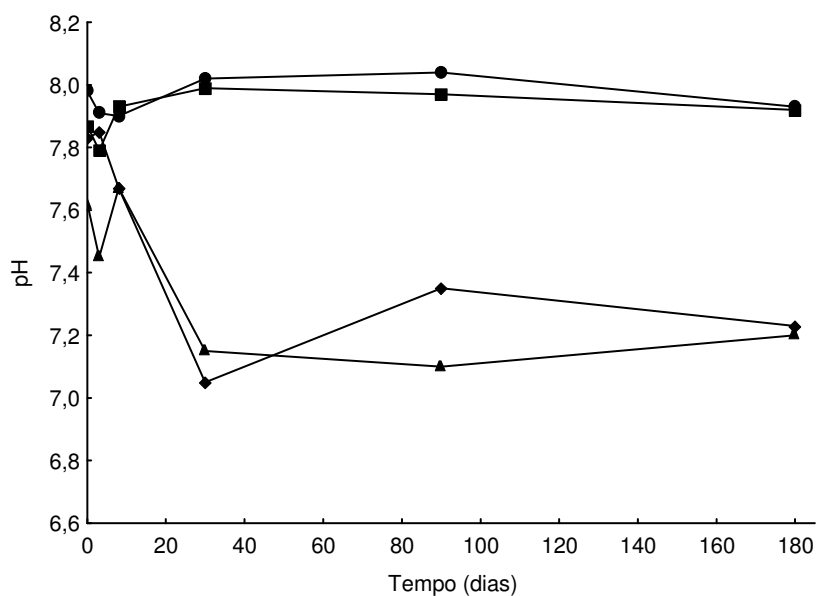


Figura 5: Acompanhamento do pH.

- F (solo); ■ G (solo+petróleo); ◆ H (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante estéril);
- ▲ I (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante não-estéril).

Durante os 180 dias de experimento, as caixas foram mantidas a uma umidade entre 65-80% da capacidade de campo conforme SARKAR et al. (2005), a temperatura oscilou entre 13 e 32°C e o pH se manteve entre 6 e 8.

### 3.2.2. Dinâmica da microbiota nativa

A Figura 6 mostra a contagem de bactérias, bolores e leveduras ao longo dos 180 dias. Os dados tabelados encontram-se em anexo.

Foi observado comportamento similar, confirmando que os nutrientes e biossurfactante atuam de forma a manter os níveis populacionais em patamares mais elevados por maiores períodos.

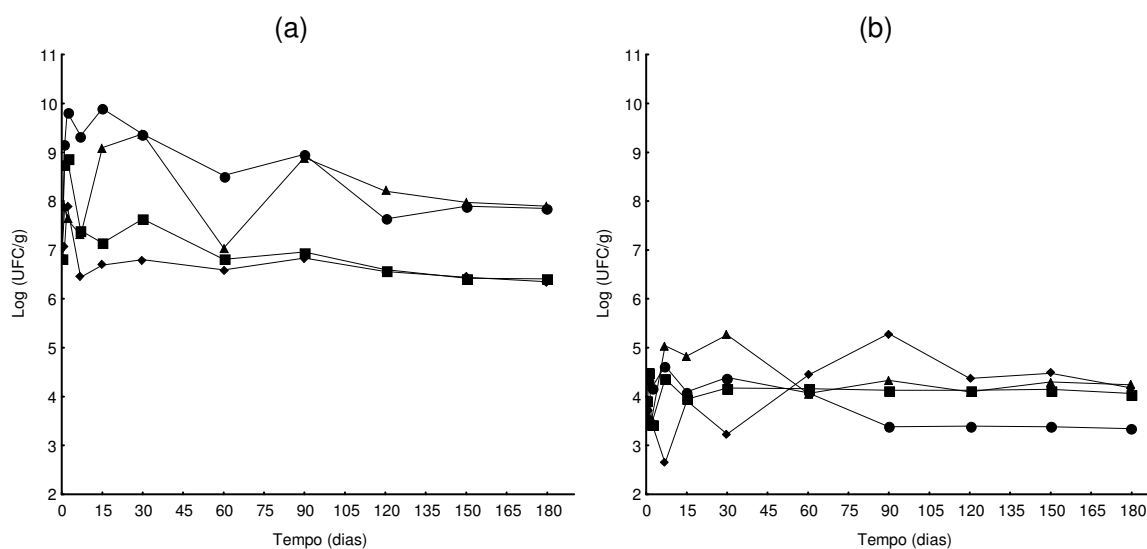


Figura 6: (a) Contagem de bactérias mesófilas e (b) contagem de bolores e leveduras.

◆ F (solo); ■ G (solo+petróleo); ● H (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante estéril);  
▲ I (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante não-estéril).

### 3.2.3. Biodegradação de petróleo

A Tabela 1 e a Figura 7 mostram a biodegradação de petróleo para os ensaios realizados na segunda etapa, também a partir dos dados fornecidos por SILVA e colaboradores (2007).

Observou-se que os tratamentos foram mais efetivos que a atenuação (20,9% de degradação), não observando-se variações pronunciadas quanto ao uso de extrato contendo biossurfactante estéril, que degradou 63,0%, e não-estéril, que degradou 59,9%, podendo-se afirmar que a *Pseudomonas aeruginosa* presente no extrato não-estéril não contribuiu para o processo degradativo. Por outro lado o uso do biossurfactante estéril é conveniente, de forma a evitar impacto sobre a microbiota local, tornando seu uso mais seguro.

**Tabela 1:** Acompanhamento da degradação de HTP.

Tempo (dias)	HTP			
	F	G	H	I
<b>0</b>	0,23	4,10	4,04	4,07
<b>90</b>	0,27	2,80	1,54	1,49
<b>180</b>	0,24	2,69	1,24	1,35

F (solo); G (solo+petróleo); H (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante estéril);  
I (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante não-estéril).

Comparando-se estes dados com aqueles obtidos na primeira etapa de estudos, verifica-se que os níveis de degradação foram sensivelmente menores, pois não foi possível reproduzir as mesmas condições experimentais, em particular a temperatura. Nesta segunda etapa, o período inicial do processo coincidiu com os meses frios de inverno, podendo ter afetado as taxas iniciais de degradação que, como já havia sido observado na primeira etapa, são maiores quando a temperatura ambiente é elevada. Conseqüentemente, as menores temperaturas podem ter afetado negativamente o processo degradativo.

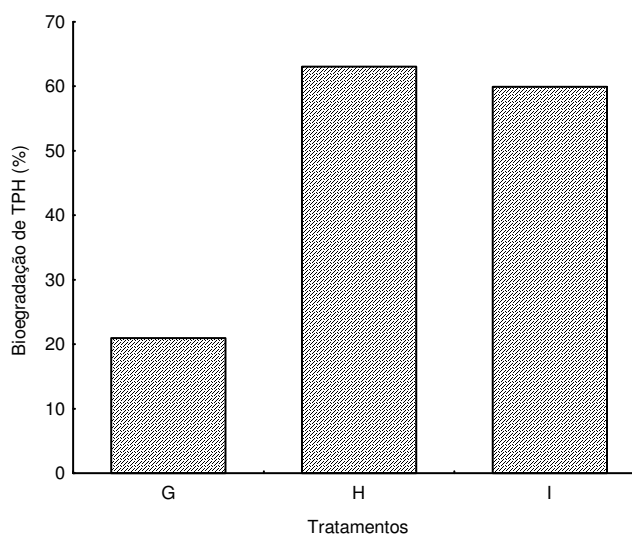


Figura 7: Percentual de biodegradação de petróleo em solo contaminado, em 180 dias.

G (solo+petróleo); H (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante estéril);  
I (solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante não-estéril).



#### 4. CONCLUSÕES

- Os tratamentos de bioestimulação propostos favoreceram a biodegradação do petróleo em solo, de até 90,4%, quando comparado com a atenuação natural (42,2%).
- A presença do extrato contendo o biossurfactante, na ausência de suplementação de N e P, favoreceu a biodegradação (58,1%), quando comparado à atenuação natural (42,2%).
- A adição de nutrientes (fonte de N e P) foi essencial para acelerar o processo de biodegradação.
- Houve uma clara correlação entre a dinâmica bacteriana e o processo degradativo.
- *Pseudomonas aeruginosa*, mesmo presente no extrato contendo o biossurfactante ramnolípido, não contribuiu para a aceleração da biodegradação.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16<sup>th</sup> Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.
- BALBUENA, E.F.; LUCAS, R.V.; PRIETO, L.M.; SANTOS, E.O.; KALIL, S.J.; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Produção e caracterização de biossurfactantes microbianos utilizando diferentes micorganismos e fontes de carbono. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Santos-SP, setembro de 2006.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

- CAMEOTRA, S.S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 111-126, 2003.
- COSTA, S.G.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, N.M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.
- CUNHA, C. D. Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo. **Dissertação**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97 p. 1996.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 729-739, 1979.
- ESSINGER D.; SGANZERLA J.; SANZO A.V.L.; BURKERT J. F.M.; KALIL S.J. Seleção de microrganismos produtores de lipase. **Anais do II Encontro de Qualidade de Alimentos e Ambiente**, Rio Grande-RS, outubro de 2004.
- GHAZALI, F.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons by microbial consortia, **Proceedings of NSF Workshop**, Kuala Lumpur, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- NAS (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES). **Oil in the Sea, Inputs, Fates and Effects**. Washington: National academy Press, p. 270-368, 1985.
- RAHMAN, K.SM.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANA PERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25-32, 2002.
- RAHMAN, K.SM.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.

- RASHEDI, H.; JAMSHIDI, E.; ASSADI, M.M.; BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2005.
- ROSETO, N.G.; PIMENTA, A.L.; DUGARTE, F.; CARVAJAL, F.G. Parameters examination of a biosurfactant production at laboratory scale. **Ciência, Tecnologia y Futuro**, v. 2, n. 4, 2003.
- SABATÉ, J.; VINÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory scale bioremediation experiments on hydrocarbon – contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 19-25. 2004.
- SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.
- SARKAR D.; FERGUSON M.; DATTA R.; BIRNBAUM S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 187-195, 2005.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p.
- TRINDADE, P.V.O.; SOBRAL L.G.; RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, v. 58, p. 512-522. 2005.
- WEISMAN, W. **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media**. V. 1. Amherst: Amherst Scientific Publishers, 1998. 98 p.

## **CAPITULO IV**

### **CONCLUSÕES GERAIS**

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Uma nova linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada a partir de amostras de resíduos de pescado capturado no extremo sul do Brasil, apresentou potencial para produção de biossurfactante do tipo ramnolipídio.

Quanto à produção de biossurfactante por fermentação em frascos agitados, *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de produzir ramnolipídios a partir de diferentes fontes de carbono, potencialmente atrativas, com melhores resultados para o óleo de soja. Nitrogênio na forma de nitrato e relação C/N 100 permitiram estabelecer uma condição nitrogênio-limitante que favoreceu a produção de ramnolipídios, atingindo-se 1,42g/L de ramnose e índice de emulsificação de 60,7%.

Esta biomolécula foi capaz de formar emulsões estáveis com diferentes hidrocarbonetos, bem como demonstrou excelente estabilidade na presença de sais e em pH alcalino, características estas associadas ao ambiente do qual o microrganismo é proveniente. Tais comportamentos permitem afirmar que o biossurfactante produzido tem grande potencial para auxiliar na biodegradação de poluentes de caráter hidrofóbico em ambientes marinho e estuarino.

Quanto à bioestimulação em solos, os tratamentos propostos, com e sem a adição de biossurfactantes, favoreceram a biodegradação de petróleo, de até 90,4%, quando comparado com a atenuação natural (42,2%). Neste processo, a adição de nutrientes foi essencial para acelerar a biodegradação, e foi observada uma clara correlação entre a dinâmica bacteriana e a degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo.

## **CAPÍTULO V**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16<sup>th</sup> Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.
- BALBUENA, E.F.; LUCAS, R.V.; PRIETO, L.M.; SANTOS, E.O.; KALIL, S.J.; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Produção e caracterização de biossurfactantes microbianos utilizando diferentes microrganismos e fontes de carbono. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Santos-SP, setembro de 2006.
- BALBUENA, E. F.; LUCAS, R. V.; SANTOS, E. O. ; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C.A.V. Produção de biossurfactantes microbianos utilizando diferentes microrganismos e fontes de carbono. **Anais do 6° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas-SP, novembro de 2005.
- BEDNARSKI W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 15-18, 2004.
- BEJAR, V.; BOUCHOTROCH, S.; MARTINEZ-CHECA, F.; CALVO, C.; QUESADA, E. Biosurfactant activity of some exopolysacchrides synthesized by halophilic microorganisms. **European Congress of Biotechnology**, Budapest, Hungary, Abstract Book, p. 17-21, 1997.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1049-1055, 2005.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J.; SANZO, E.O.; RIBEIRO, F. Fungos filamentosos degradadores de poluentes orgânicos: avaliação das velocidades de crescimento

- radial em diferentes hidrocarbonetos. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia de Química**, Curitiba-PR, setembro de 2004.
- CAMEOTRA, S.S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 111-126, 2003.
- CAPREZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.; PEREIRA, D. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.
- CASSIDY, D.P., HUDAK, A.J. Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, p. 253-264, 2001.
- CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R.M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.
- CHEN, C.C.; RIADI, L.; SUH, S.J.; OHMAN, D.E.; JU, L.K. Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 117, p. 1-10, 2005.
- COLLERAN, E. Uses of bacteria in bioremediation. In: Sheehan, D. **Methods in Biotechnology**. v.2. Bioremediation Protocols. Totowa: Humana Press, p. 3-22, 1997.
- COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.
- COSTA, S.G.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, N.M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.
- CUNHA, C. D. Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo. **Dissertação**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97 p. 1996.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 729-739, 1979.



- DUBOIS, M.K.A.; GILLES, J.K.; HAMILTON, P.A.; SMITH, R.F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ESSINGER D.; SGANZERLA J.; SANZO A.V.L.; BURKERT J. F. M.; KALIL S. J. Seleção de microrganismos produtores de lipase. **Anais do II Encontro de Qualidade de Alimentos e Ambiente**, Rio Grande-RS, outubro de 2004.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.
- GARTI, N. What can nature offer from emulsifier point of view: trends and progress. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 125-146, 1999.
- GAYLARDE, C. Seleção de microrganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção. In: Silva, C. M. M. S.; Roque, M. R. A.; Melo, I. S. **Microbiologia Ambiental: manual de laboratório**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 98 p.
- GHAZALI, F.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons by microbial consortia. **Proceedings of NSF Workshop**, Kuala Lumpur, 2001.
- GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.A.; DUARTE, M.S.; LIMA, G.M.S.; ARAÚJO, J.M. Bactérias produtoras de biosurfactantes. **Biociência**, n. 30, p. 39-45, 2003.
- GUERRA – SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied Environmental Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.
- ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.
- ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. **The Journal of Antibiotics**, n. 12. p. 855-859, 1971.

- KIM, S.G.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Norcadia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 1997.
- KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Biosurfactants and biotechnology. In: **Surfactants Science Series**. New York: Marcel Dekker, v. 25, 1987.
- LIMA, L.A.K.C.; MACEDO, G.R.; MAGALHÃES, M.M.A.; BEZERRA, M.S.; ALMEIDA, D.V.; COSTA, A.S.S. Estudo Cinético da Produção de Biosurfactante. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Natal-RN, setembro de 2002.
- LIN, S. C.; LIN, K. G.; LO, C. C.; LIN, Y. M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 267-273, 1998.
- LINHARDT, R. J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1998.
- MAIER, R.M., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 37-42, 1997.
- MILLIOLI, V.S.; SANTOS, L.C. Avaliação da concentração ótima de biosurfactante no processo de biorremediação de solo contaminado por petróleo cru. **Anais da XII Jornada de Iniciação Científica**, Rio de Janeiro-RJ, 2004a.
- MILLIOLI, V.S.; SANTOS, L.C. Avaliação da potencialidade do uso de biosurfactante no processo de biorremediação de solo contaminado por petróleo cru. **Anais da XII Jornada de Iniciação Científica**, Rio de Janeiro-RJ, 2004b.
- MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Edição. Editora LTC. Rio de Janeiro-RJ, 2004.

- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 11, 1989.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- NAS (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES). **Oil in the Sea, Inputs, Fates and Effects**. Washington: National academy Press, p. 270-368, 1985.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 63-67, 2003.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes - review. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PASSOS, C.T. Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. **Dissertação**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 76 p. 2006.
- PEIXOTO, E.C.D.; RODRIGUES, C.E.C.; MEIRELLES, A.J.A. Estudo do equilíbrio líquido-líquido do sistema óleo de soja refinado/ ácido linoléico comercial/ etanol hidratado, à 25°C. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Campinas-SP, 2005.
- PERFUMO, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; VEZZULLI, L. Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. **Chemosphere**, v. 66, p. 179-184, 2007.
- QUINES, L.K.M; BIANCHINI, C.S.; SANZO, A.V.L.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Isolamento de bactérias produtoras de lipase a partir de resíduos da indústria de pescado. **Anais da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**, Gramado-RS, março de 2004.

- RAHMAN, K.SM.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANA PERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25-32, 2002.
- RAHMAN, K.SM.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.
- RASHEDI, H.; JAMSHIDI, E.; ASSADI, M.M.; BONAKDARPOUR, B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 121-127, 2005.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora Gráfica Universitária – UFPel, 2000.
- RIBEIRO, F.; SANZO, A.V.L.; KALIL,S.J.; BURKERT, J.F.M.; BURKERT, C.A.V. Isolamento de microrganismos degradadores de poluentes oriundos da indústria do petróleo. **Anais do I Simpósio Tendências e Perspectivas da Oleoquímica e da petroquímica**, 20 a 22 de novembro de 2002, Rio Grande-RS.
- ROSETO, N.G.; PIMENTA, A.L.; DUGARTE, F.; CARVAJAL, F.G. Parameters examination of a biosurfactant production at laboratory scale. **Ciência, Tecnologia y Futuro**, v. 2, n. 4, 2003.
- SABATÉ, J.; VINÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory scale bioremediation experiments on hydrocarbon – contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 19-25, 2004.
- SANTA ANNA, L.M.M.S. Produção de Biosurfactantes do Tipo Rhamnolipídeo por *Pseudomonas* sp. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2000.
- SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas*

- aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.
- SANTOS, E.O.; ROSA, C.F.C.; SANZO, A.V.L.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. Fungos filamentosos degradadores de poluentes: avaliação das velocidades de crescimento radial em diferentes concentrações de fenol. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife-PE, setembro de 2004.
- SARKAR D.; FERGUSON M.; DATTA R.; BIRNBAUM S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 187-195, 2005.
- SCHMID, A.; KOLLMER, A.; WITHOLT, B. Effects of biosurfactant and emulsification on two-liquid phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and cell-free emulsions containing n-decane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 487-493, 1998.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p.
- THASSITOU, P.K.; ARVANITOYANNIS, I.S. Bioremediation: a novel approach to food waste management. **Trends in Food e Technology**, v. 12, p.185-196, 2001.
- TRINDADE, P.V.O.; SOBRAL L.G.; RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, v. 58, 512-522, 2005.
- WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995.
- WEISMAN, W. **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media**. V. 1. Amherst: Amherst Scientific Publishers, 1998. 98 p.
- WU, J.; JU, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, n. 54, p. 193-202, 1996.

## **ANEXOS**

Tabela 1: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de carbono, em 48h de fermentação. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Fonte de carbono</b>	<b>IE<sub>24</sub>(%)</b>
Óleo de soja	56,4 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
Óleo de pescado	53,5 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>
Borra de óleo de soja	44,8 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
Glicerol	45,5 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
Glicose	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>

Tabela 2: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de carbono, em 72h de fermentação. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Fonte de carbono</b>	<b>Ramnose (g/L)</b>
Óleo de soja	0,94 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Óleo de pescado	0,54 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
Borra de óleo de soja	0,70 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
Glicerol	0,39 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>
Glicose	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>e</sup>

Tabela 3: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de nitrogênio, em 96 de fermentação. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Fonte de nitrogênio</b>	<b>IE<sub>24</sub>(%)</b>
Nitrato de sódio	62,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Nitrato de amônio	56,4 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
Uréia	21,5 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>
Sulfato de amônio	14,4 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup>

Tabela 4: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes fontes de nitrogênio, em 96 de fermentação. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte de nitrogênio	Ramnose (g/L)
Nitrato de sódio	0,94 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Nitrato de amônio	0,94 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Uréia	0,65 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Sulfato de amônio	0,23 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>

Tabela 5: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes relações C/N, em 96 de fermentação. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Relação C/N	IE <sub>24</sub> (%)
10	34,1 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
22	62,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
40	46,7 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>
60	49,3 $\pm$ 1,3 <sup>c,d</sup>
80	50,7 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>
100	60,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>

Tabela 6: Concentração de ramnose média  $\pm$  desvio padrão para diferentes relações C/N, em 96 de fermentação. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Relação C/N	Ramnose (g/L)
10	1,1 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
22	0,9 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
40	1,0 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
60	1,3 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
80	1,4 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
100	1,4 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>



Tabela 7: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes salinidades, após 96h de cultivo. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>NaCl (%)</b>	<b>IE<sub>24</sub>(%)</b>
0	58,9 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>
0,5	56,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
1,0	52,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
3,0	50,0 $\pm$ 0,0 <sup>b,c</sup>
5,0	46,7 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>
10,0	41,1 $\pm$ 1,9 <sup>d</sup>
20,0	34,4 $\pm$ 1,9 <sup>e</sup>

Tabela 8: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes pHs, após 96h de cultivo. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>pH</b>	<b>IE<sub>24</sub>(%)</b>
4,0	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
5,0	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
6,0	60,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
7,0	56,7 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
8,0	55,6 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>
9,0	54,4 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>

Tabela 9: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes temperaturas, após 96h de cultivo. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>IE<sub>24</sub>(%)</b>
20	53,3 $\pm$ 3,3 <sup>a,c</sup>
30	54,4 $\pm$ 1,9 <sup>a,c</sup>
35	62,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
40	63,3 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>
50	56,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
70	52,2 $\pm$ 1,9 <sup>a,c</sup>
100	51,1 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>

Tabela 10: Índice de emulsificação médio  $\pm$  desvio padrão para diferentes hidrocarbonetos, após 96h de cultivo. Letras iguais indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Hidrocarbonetos</b>	<b>IE<sub>24</sub>(%)</b>
Hexano	38,9 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>
Óleo de soja	58,9 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
Óleo de pescado	44,4 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>
Óleo diesel	55,6 $\pm$ 1,9 <sup>b,d</sup>
Petróleo	52,2 $\pm$ 1,9 <sup>d,e</sup>
Gasolina	53,3 $\pm$ 0,0 <sup>b,c,e</sup>
BTX	52,2 $\pm$ 1,9 <sup>d,e</sup>
Ciclohexano	53,3 $\pm$ 3,3 <sup>b,c,e</sup>
Clorobenzeno	52,2 $\pm$ 1,9 <sup>d,e</sup>

Tabela 11: Contagem de bactérias, bolores e leveduras na primeira etapa do experimento.

Tempo (dias)	Microrganismos	A (UFC/g)	B (UFC/g)	C (UFC/g)	D (UFC/g)	E (UFC/g)
0	Bactérias	$9,15 \times 10^4$	$5,95 \times 10^4$	$5,90 \times 10^4$	$6,80 \times 10^6$	$7,15 \times 10^6$
	Bolores e Leveduras	$5,25 \times 10^3$	$3,35 \times 10^3$	$5,35 \times 10^3$	$4,75 \times 10^3$	$6,25 \times 10^3$
2	Bactérias	$4,40 \times 10^6$	$3,75 \times 10^7$	$2,75 \times 10^7$	$1,03 \times 10^9$	$8,80 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$8,10 \times 10^3$	$4,80 \times 10^3$	$4,10 \times 10^3$	$6,20 \times 10^3$	$5,35 \times 10^3$
7	Bactérias	$2,50 \times 10^7$	$3,00 \times 10^7$	$7,35 \times 10^8$	$5,70 \times 10^8$	$5,35 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$9,00 \times 10^3$	$5,10 \times 10^3$	$6,70 \times 10^3$	$4,35 \times 10^3$	$8,30 \times 10^3$
15	Bactérias	$3,00 \times 10^7$	$7,95 \times 10^6$	$7,20 \times 10^9$	$6,75 \times 10^9$	$6,60 \times 10^9$
	Bolores e Leveduras	$6,70 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$4,55 \times 10^3$	$6,90 \times 10^3$
30	Bactérias	$1,18 \times 10^7$	$1,18 \times 10^6$	$3,50 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$	$1,26 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$1,15 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$	$1,35 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$
60	Bactérias	$6,55 \times 10^6$	$8,40 \times 10^6$	$3,45 \times 10^7$	$3,30 \times 10^8$	$2,75 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$5,6 \times 10^2$	$1,01 \times 10^4$	$6,35 \times 10^2$	$1,03 \times 10^4$	$6,55 \times 10^2$
90	Bactérias	$1,26 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7$	$5,90 \times 10^6$	$8,30 \times 10^7$	$1,48 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$1,50 \times 10^4$	$4,00 \times 10^3$	$3,60 \times 10^2$	$4,85 \times 10^3$	$1,60 \times 10^2$
120	Bactérias	$5,50 \times 10^6$	$5,50 \times 10^6$	$2,75 \times 10^8$	$5,75 \times 10^7$	$4,50 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$8,30 \times 10^3$	$4,65 \times 10^3$	$2,75 \times 10^3$	$7,30 \times 10^4$	$9,10 \times 10^3$
150	Bactérias	$4,80 \times 10^6$	$5,45 \times 10^6$	$5,50 \times 10^7$	$4,80 \times 10^7$	$3,60 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$5,50 \times 10^3$	$2,75 \times 10^3$	$3,30 \times 10^2$	$1,90 \times 10^4$	$2,10 \times 10^2$
180	Bactérias	$4,85 \times 10^6$	$3,90 \times 10^6$	$1,98 \times 10^7$	$8,70 \times 10^6$	$1,07 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$2,50 \times 10^3$	$2,30 \times 10^3$	$3,00 \times 10^2$	$1,80 \times 10^4$	$1,60 \times 10^2$

A=solo; B=solo+petróleo; C=solo+petróleo+nutrientes; D=solo+petróleo+biossurfactante;

E=solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante.

Tabela12: Contagem de bactérias, bolores e leveduras na segunda etapa do experimento.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>F (UFC/g)</b>	<b>G (UFC/g)</b>	<b>H (UFC/g)</b>	<b>I (UFC/g)</b>
<b>0</b>	Bactérias	$6,35 \times 10^6$	$6,50 \times 10^6$	$6,80 \times 10^6$	$6,70 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$2,50 \times 10^3$	$8,10 \times 10^3$	$3,65 \times 10^3$	$2,95 \times 10^3$
<b>1</b>	Bactérias	$1,18 \times 10^7$	$5,50 \times 10^8$	$1,39 \times 10^9$	$7,45 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$2,20 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$5,10 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$
<b>2</b>	Bactérias	$8,75 \times 10^7$	$7,60 \times 10^8$	$6,65 \times 10^9$	$4,30 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$1,50 \times 10^4$	$2,75 \times 10^3$	$2,95 \times 10^3$	$3,40 \times 10^3$
<b>7</b>	Bactérias	$2,75 \times 10^6$	$2,50 \times 10^7$	$2,20 \times 10^9$	$2,00 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$4,25 \times 10^4$	$2,30 \times 10^4$	$4,40 \times 10^2$	$1,10 \times 10^5$
<b>15</b>	Bactérias	$4,95 \times 10^6$	$1,39 \times 10^7$	$7,80 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$
	Bolores e Leveduras	$1,25 \times 10^4$	$8,90 \times 10^3$	$8,20 \times 10^3$	$6,80 \times 10^4$
<b>30</b>	Bactérias	$6,35 \times 10^6$	$4,30 \times 10^7$	$2,37 \times 10^9$	$2,38 \times 10^9$
	Bolores e Leveduras	$2,45 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,70 \times 10^3$	$1,85 \times 10^5$
<b>60</b>	Bactérias	$3,90 \times 10^6$	$6,45 \times 10^6$	$3,35 \times 10^8$	$1,10 \times 10^7$
	Bolores e Leveduras	$1,20 \times 10^4$	$1,45 \times 10^4$	$2,75 \times 10^4$	$2,30 \times 10^4$
<b>90</b>	Bactérias	$6,80 \times 10^6$	$9,10 \times 10^6$	$9,10 \times 10^8$	$7,90 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$2,40 \times 10^3$	$1,35 \times 10^4$	$1,95 \times 10^5$	$2,15 \times 10^4$
<b>120</b>	Bactérias	$3,60 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$4,30 \times 10^7$	$1,16 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$2,40 \times 10^3$	$1,40 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$
<b>150</b>	Bactérias	$2,75 \times 10^6$	$2,65 \times 10^6$	$7,90 \times 10^7$	$9,40 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$2,40 \times 10^3$	$1,40 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$
<b>180</b>	Bactérias	$2,25 \times 10^6$	$2,55 \times 10^6$	$7,15 \times 10^7$	$7,90 \times 10^8$
	Bolores e Leveduras	$2,20 \times 10^3$	$1,15 \times 10^4$	$1,50 \times 10^4$	$1,75 \times 10^4$

F=solo; G=solo+petróleo; H=solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante estéril;

I=solo+petróleo+nutrientes+biossurfactante não-estéril.

Figura 1: Curva padrão de ramnose.

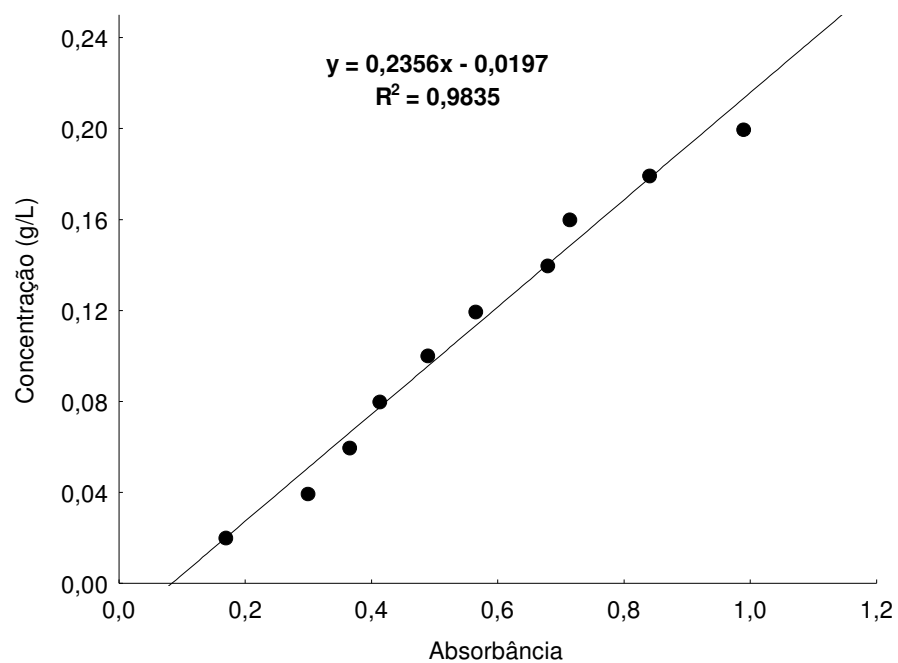


Figura 2: Curva padrão de biomassa.

