



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

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE BACTÉRIAS E MICROALGAS E  
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS

Quím. ROQUE LOURENÇO ZILIO

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Orientador

RIO GRANDE, RS

2017



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

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE BACTÉRIAS E MICROALGAS E  
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS

Quím. ROQUE LOURENÇO ZILIO

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de doutor em Engenharia e Ciência  
de Alimentos da Universidade  
Federal do Rio Grande.

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA  
Orientador

RIO GRANDE, RS

2017

## Ficha catalográfica

Z69p

Zilio, Roque Lourenço.

Produção de biossurfactantes de bactérias e microalgas e biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos / Roque Lourenço Zilio. – 2017.

155 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

1. Bactérias 2. Biorremediação 3. Biossurfactantes  
4. Hidrocarbonetos 5. Policíclicos aromáticos 6. Microalgas  
I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Título.

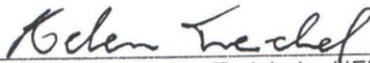
CDU 664.95

## APROVAÇÃO

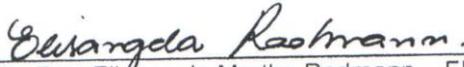
Tese defendida por Roque Lourenço Zilio e aprovada em 18 de janeiro de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



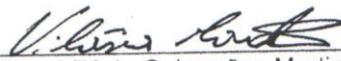
Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



Profa. Dra. Helen Treichel – UFFS



Profa. Dra. Elisângela Martha Radmann – FURG



Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins – FURG



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG



## **AGRADECIMENTOS**

### **A Deus**

Pela vida e forças para seguir em frente.

### **Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa**

Pela experiência transmitida, exemplo, orientação, apoio e amizade.

### **Aos meus pais Ivalino (in memórium) e Ires**

Pela educação que me proporcionaram pelo carinho e amor e pelo que sou hoje.

### **Às minhas irmãs Claudete e Bernardete (in memórium)**

Pelo carinho, amizade e amor que nunca me faltou.

### **À minha filha Luísa M. Zarpellon Zilio**

Pelo amor, carinho e compreensão em minhas faltas.

### **À minha esposa Daniela Gimenes Nuñez**

Pelo amor, carinho e dedicação.

### **Ao amigo Paulo R. S. Munhoz esposa Tonia, filhas, Laurem, Lívia e Lorena**

Pela confiança, amizade e apoio.

### **À Mara Alice Medeiros, Luismar Duarte Souza**

Pela ajuda, apoio, dedicação e coleguismo.

### **Aos professores da pós-graduação**

Pelos conhecimentos e experiências passados, em especial a professora Eliana Badiale

Furlong.

### **À Elisângela Martha Radmann**

Pela grande contribuição ao trabalho, experiência, apoio e pela grande amizade.

**À professora, Vilásia Guimarães Martins**  
Pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

**À pós-graduanda Paola Martins**  
Pelo apoio e desenvolvimento do trabalho.

**À graduanda Amanda Moraes**  
Pela ajuda indiscutível neste trabalho.

**A todo o pessoal do LEB, em especial Aline Mássia, Cristiane Lisboa, Thaisa Santos,  
Jessica Hatwig Duarte, Gabriel da Rosa e Luiza Moraes.**  
Que de uma maneira ou outra sempre me ajudaram e contribuíram para a concretização deste  
trabalho.

**À secretária do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,  
Islanda Passos**  
Pelos favores prestados junto ao curso e para o desenvolvimento do trabalho, ainda pela  
grande amizade.

**À técnica Sergiane Caldas Barbosa**  
Pelo apoio e ajuda no desenvolvimento desta tese.

**À Fundação André Tosello**  
Pela doação das cepas de *Bacillus subtilis* CCT 7678.

## RESUMO

A exploração, transporte e consumo de petróleo e seus derivados causa a liberação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) no ambiente. A Universidade Federal do Rio Grande está voltada ao ecossistema costeiro e através de seus pesquisadores vem desenvolvendo alternativas que possam diminuir impactos ambientais que ocorram pelo derrame de petróleo e seus derivados. A biorremediação consiste em utilizar micro-organismos para a degradação destes compostos, que são altamente prejudiciais à saúde humana. Uma maneira de aumentar a biodisponibilidade dos HAP aos micro-organismos degradadores é a aplicação de biossurfactantes, compostos tenso ativos, que podem ser produzidos por bactérias e microalgas. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção e aplicação de biossurfactantes a partir de bactérias e microalgas na biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível. O trabalho foi dividido em duas etapas: 1) produção de biossurfactantes pelas bactérias *Bacillus subtilis* CCT 7678 e *Corynebacterium aquaticum* e posterior biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível; 2) produção de biossurfactantes pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 e posterior biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível. Na primeira etapa, a bactéria *Bacillus subtilis* foi cultivada em fermentação submersa, com duração de 72 h, em fermentador tipo Erlenmeyer de 1000 mL, utilizando glicose 4 % com adição de nutrientes inorgânicos. O processo foi conduzido a 30 °C, 200 rpm e pH inicial 7,0. A bactéria *Corynebacterium aquaticum* foi cultivada através de fermentação em estado sólido, com duração de 144 h em biorreatores de coluna com leito fixo usando farelo de trigo (85 %) e casca de arroz (15 %) com adição de nutrientes inorgânicos. A umidade foi ajustada para 65 %, a temperatura 30°C, a aeração 60 mL.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e o pH 6,5. O processo foi monitorado a cada 24 h. Os biossurfactantes obtidos foram utilizados no processo de biorremediação de solo contaminado com petróleo e óleo combustível. Com *Corynebacterium aquaticum* foram obtidos os melhores resultados de tensão superficial (30,4 mN m<sup>-1</sup>) e atividade emulsificante (99,7 %). Tanto no solo contaminado com petróleo, como no solo contaminado com óleo combustível, as maiores taxas de degradação de HAP (97,3 e 93,5 %, respectivamente) foram obtidas com os biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum*. Na segunda etapa, as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115 foram cultivadas em meio BG 11, em fotobiorreatores de 5 e 10 L, com concentração inicial de 0,2 g L<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 12 h claro/escuro e iluminância de 3200 lux, durante 10 d. O processo foi realizado a 30 °C e aeração de 0,5 vvm. Com *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117, foram obtidos os melhores resultados de tensão superficial, 25,3 e 28,3 mN m<sup>-1</sup>, respectivamente e de atividade emulsificante, 78,6 e 97,3 %, respectivamente. Maiores taxas de degradação de HAP em solo contaminado com petróleo foram obtidas com biossurfactantes de *Scenedesmus obliquus* LEB 117 (93,1 %). Em solo contaminado com óleo combustível, a maior taxa de degradação foi obtida com biossurfactante de *Chlorella fusca* LEB 111 (87,8 %). Os biossurfactantes obtidos a partir das duas bactérias e microalgas utilizadas neste estudo, apresentaram resultados satisfatórios na redução da tensão superficial e atividade emulsificante, além de elevada degradação de HPAs, tanto em solo contaminado com petróleo, quanto em solo contaminado com óleo combustível.

**Palavras-chave:** Bactérias, biorremediação, biossurfactante, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, microalgas.



## ABSTRACT

The exploration, transportation, and consumption of petroleum and its derivatives cause the release of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) into the environment. The Federal University of Rio Grande is turned to the coastal ecosystem and through its researchers has been developing alternatives that may reduce environmental impacts occurring from the petroleum spill and its derivative products. Bioremediation consists in using microorganisms for degradation of these compounds which are highly harmful to human health. A way to increase the bioavailability of PHAs to the degrading microorganisms is the appliance of biosurfactants, surface-active compounds that can be produced by bacteria and microalgae. The objective of this work was to study the production and application of biosurfactants from bacteria and microalgae in the bioremediation of soils contaminated with petroleum and fuel oil. The work was divided into two phases: 1) production of biosurfactant by the bacteria *Bacillus subtilis* CCT 7678 and *Corynebacterium aquaticum* and subsequent bioremediation of soils contaminated with petroleum and fuel oil: 2) production of biosurfactant by the microalgae *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 and *Synechococcus nidulans* LEB 115 and subsequent bioremediation of soils contaminated with petroleum and fuel oil. In the first phase, the bacteria *Bacillus subtilis* was cultivated in submerged fermentation, during 72 h, in 1000 mL erlenmayer fermenter, with inorganic nutrients addition, using 4 % glucose as the carbon source. The process was conducted at 30 °C, 200 rpm and initial pH 7.0. The bacteria *Corynebacterium aquaticum* was cultivated in solid-state fermentation, during 144 h in fixed-bed column bioreactors using wheat bran (85 %) and rice hull (15 %), with inorganic nutrients addition. The moisture was adjusted to 65 %, the temperature was 30 °C, the aeration 60 mL g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and pH 6.5. The process was monitored every 24 h. The biosurfactants obtained were used in the bioremediation process of soil contaminated with petroleum and fuel oil. The best results for surface tension (30.4 mN m<sup>-1</sup>) and emulsifying activity (99.7 %) were obtained with *Corynebacterium aquaticum*. Both to the petroleum-contaminated soil, and for fuel oil-contaminated soil, the highest rates of PAH degradation (97.3 e 93.5 %, respectively) were obtained with the biosurfactants of *Corynebacterium aquaticum*. In the second phase, the microalgae *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 and *Synechococcus nidulans* LEB 115 were cultivated in BG 11 medium, in 5 and 10 L photobioreactors, with initial concentration of 0.2 g L<sup>-1</sup>, photoperiod of 12 h light/dark and illuminance of 3200 lux during 10 d. The process was carried out at 30 °C with 0.5 vvm of aeration. The best results for surface tension obtained to *Chlorella fusca* LEB 111 and *Scenedesmus obliquus* LEB 117 were 25.3 e 28.3 mN m<sup>-1</sup>, respectively, and 78.6 e 97.3 % to emulsifying activity. Higher rates of PAH degradation in petroleum-contaminated soil were obtained with biosurfactants from *Scenedesmus obliquus* LEB 117(93.1 %). In soil contaminated with oil fuel, the highest rate of degradation was obtained with biosurfactant from *Chlorella fusca* LEB 11 (87.8 %). The biosurfactants obtained from the two bacteria and microalgae used in this study, presented satisfactory results in the reduction of surface tension and emulsifying activity, as well as high degradation of PAH, both in soil contaminated with petroleum and in soil contaminated with fuel oil.

**Keywords:** Bacteria, bioremediation, biosurfactant, microalgae, polycyclic aromatic hydrocarbons



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Biossurfactantes, organismos produtores e suas aplicações.....	50
<b>Tabela 2</b> - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678.....	146
<b>Tabela 3</b> - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de <i>Corynebacterium aquaticum</i> .....	147
<b>Tabela 4</b> - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111.....	148
<b>Tabela 5</b> - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117.....	149
<b>Tabela 6</b> - Valores de pH durante a biorremediação .....	150
<b>Tabela 7</b> - Valores de temperatura durante a biorremediação .....	151
<b>Tabela 8</b> - Composição do meio BG-11 .....	155

### ARTIGO 1

<b>Tabela 1</b> - Classificação granulométrica de solo arenoso.....	78
<b>Tabela 2</b> - Delineamento experimental da biorremediação .....	80
<b>Tabela 3</b> - Tensão superficial e atividade emulsificante dos biossurfactantes produzidos por <i>Corynebacterium aquaticum</i> e <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678.....	82
<b>Tabela 4</b> - Contagem de micro-organismos nativos presentes no solo.....	83
<b>Tabela 5</b> - Valores máximos e mínimos de pH e temperatura durante os processos de biorremediação .....	84

### ARTIGO 2

<b>Tabela 1</b> - Análise granulométrica do solo arenoso utilizado.....	100
<b>Tabela 2</b> – Delineamento experimental da biorremediação .....	102
<b>Tabela 3</b> - Tensão superficial dos biossurfactantes produzidos pelas microalgas <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117, <i>Scenedesmus actus</i> LEB 116 e <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115.....	105

<b>Tabela 4</b> - Contagem de micro-organismos nativos presentes no solo .....	106
<b>Tabela 5</b> - Valores máximos e mínimos para os parâmetros avaliados para HAP .....	107

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Fermentação em biorreatores de coluna.....	34
<b>Figura 2-</b> Hidrocarbonetos representativos na composição do petróleo. ....	40
<b>Figura 3-</b> Esquema da ação dos micro-organismos em processos de biorremediação.....	43
<b>Figura 4-</b> Via de degradação aeróbia de hidrocarbonetos poliaromáticos .....	45
<b>Figura 5 -</b> Degradação de hidrocarbonetos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração.....	45
<b>Figura 6 -</b> Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: fosfofrutoquinase (A), piruvato quinase (B), isocitrato desidrogenase (C), citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos) (D), piruvato desidrogenase (E) e piruvato carboxilase (F).....	54
<b>Figura 7 -</b> Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: isocitrato liase (A), malato sintase (B), fosfoenolpiruvato carboxilase (C) e frutose 1,6 ifosfatase.....	56
<b>Figura 8 -</b> Laudo técnico do petróleo .....	153
<b>Figura 9 -</b> Laudo técnico do óleo combustível .....	154

### ARTIGO 1

<b>Figura 1 -</b> Inóculos de crescimento de <i>Corynebacterium aquaticum</i> e <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678.....	73
<b>Figura 2 -</b> Esquema do cultivo em estado sólido em biorreator de coluna.....	74
<b>Figura 3 -</b> Fermentação submersa de <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678 .....	75
<b>Figura 4 -</b> Medição da tensão superficial em tensiômetro.....	77
<b>Figura 5 -</b> Teste de atividade emulsificante.....	77
<b>Figura 6 -</b> Homogeneização das amostras para biorremediação .....	79
<b>Figura 7 -</b> Biorreator de vidro utilizado no processo de biorremediação .....	80
<b>Figura 8 -</b> Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado por petróleo: (a) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Corynebacterium aquaticum</i> e (b) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678.....	86

<b>Figura 9</b> - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado com óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Corynebacterium aquaticum</i> e (b) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678.....	87
<b>Figura 10</b> - Degradação (%) de HAP em solos contaminados por petróleo e óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Corynebacterium aquaticum</i> e (b) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678.....	89

## ARTIGO 2

<b>Figura 1</b> – Liofilização das microalgas .....	98
<b>Figura 2</b> - Medição da tensão superficial em tensiômetro. ....	99
<b>Figura 3</b> - Teste de atividade emulsificante. ....	99
<b>Figura 4</b> - Homogeneização das amostras para biorremediação.....	101
<b>Figura 5</b> - Biorreator de vidro utilizado no processo de biorremediação. ....	102
<b>Figura 6</b> - Curvas de crescimento das microalgas (a) <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, (b) <i>Scenedesmos obliquus</i> LEB 117, (c) <i>Scenedesmus actus</i> LEB 116 e (d) <i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115 .....	104
<b>Figura 7</b> - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado com petróleo: (a) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111e (b) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117 .....	109
<b>Figura 8</b> - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado com óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111e (b) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117 .....	110
<b>Figura 9</b> - Degradação (%) de HAP em solos contaminados por petróleo e óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111e (b) ensaio com biossurfactante obtido de <i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117 .....	112

## NOMENCLATURA

$AE_{o/w}$  = Atividade emulsificante de óleo em água

BTEX = Benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno

CGTEE = Companhia de Geração Termica de Energia Elétrica

CMC = Concentração micelar crítica

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DRBC = Dicloran Rosa de Bengala

EPA = *Environmental Protection Agency*

FDA = *Food and Drug Administration*

FEA/UNICAMP = Faculdade de Engenharia Alimentos da Universidade Estadual de Campinas

FES = Fermentação em estado sólido

GRAS = *Generally Recognized as Safe*

HAP = Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

LEB = Laboratório de Engenharia Bioquímica

LED = Diodo emissor de luz

MEOR = Microbiológica Recuperação Avançada de Petróleo

$mN m^{-1}$  = miliNewton por metro

nm = Nanômetros

PCA = Ágar Padrão para Contagem

rpm = Rotação por minuto

UFC  $g^{-1}$  = Unidades Formadoras de Colônias por grama

USEPA = Agência Americana de Proteção Ambiental

vvm = Volume de ar por volume de meio

$v v^{-1}$  = volume por volume

$\mu g L^{-1}$  = microgramas por litro

$\mu M$  = micromolar



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	23
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1. OBJETIVOS .....	27
1.1.1. Geral .....	27
1.1.2. Específicos.....	27
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	29
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	31
2.1. FERMENTAÇÃO .....	31
2.1.1. Fermentação em estado sólido.....	32
2.1.2. Fermentação submersa .....	34
2.2. MICROALGAS .....	35
2.2.1. Condições de cultivo de microalgas .....	36
2.3. SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS .....	39
2.4. REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS .....	41
2.4.1. Biorremediação.....	42
2.4.2. Técnicas de biorremediação de solos .....	46
2.4.2.1. Biorremediação In-situ .....	46
2.4.2.2. Biorremediação Ex-situ .....	48
2.5. BIOSURFACTANTES .....	49
2.5.1. Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes .....	52
2.5.1.1. Fonte de carbono .....	52
2.5.1.2. Fonte de nitrogênio.....	55
2.5.1.3. Fatores físico-químicos .....	57
2.5.2. Produção de biossurfactantes por bactérias .....	60
2.5.2.1. <i>Bacillus</i> .....	60
2.5.2.2. <i>Corynebacterium</i> .....	62
2.5.3. Produção de biossurfactantes por microalgas .....	63
<b>CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO</b> .....	67
<b>ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS E SUA UTILIZAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS</b> .....	71
<b>RESUMO</b> .....	71
<b>ABSTRACT</b> .....	71
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	72

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
2.1	PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....	73
2.1.1	Crescimento e manutenção dos micro-organismos.....	73
2.1.2	Fermentação em estado sólido .....	74
2.1.3	Fermentação submersa.....	75
2.1.4	Extração dos biossurfactantes .....	76
2.2	AVALIAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES .....	76
2.2.1	Determinação da tensão superficial .....	76
2.2.2	Atividade emulsificante .....	77
2.3	TRATAMENTO DOS DADOS.....	77
2.4	APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS .	78
2.4.1	Coleta da amostra de solo .....	78
2.4.2	Determinação de fungos e bactérias totais no solo.....	78
2.5	PREPARAÇÃO DO ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO .....	79
2.5.1	Homogeneização.....	79
2.5.2	Biorremediação .....	80
2.6	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS PARA A BIORREMEDIAÇÃO .....	81
2.6.1	Determinação de pH e temperatura.....	81
2.6.2	Determinação de hidrocarbonetos .....	81
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
3.1	PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....	81
3.2	BIORREMEDIAÇÃO.....	82
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>
	<b>ARTIGO 2: BIOSSURFACTANTES DE MICROALGAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....</b>	<b>94</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>95</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>95</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>97</b>
2.1	PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....	97
2.1.1	Crescimento e manutenção dos micro-organismos.....	97
2.1.2	Condições de cultivo .....	97
2.1.3	Determinação da Concentração celular .....	97
2.2	EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	98
2.3	AVALIAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES .....	98

<b>2.3.1</b>	<b>Determinação da tensão superficial</b> .....	98
<b>2.3.2</b>	<b>Atividade emulsificante</b> .....	99
<b>2.4</b>	<b>TRATAMENTO DOS DADOS</b> .....	100
<b>2.5</b>	<b>APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS</b> 100	
<b>2.5.1</b>	<b>Coleta da amostra de solo</b> .....	100
<b>2.5.2</b>	<b>Determinação de fungos e bactérias totais no solo</b> .....	100
<b>2.6</b>	<b>PREPARAÇÃO DO ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO</b> .....	101
<b>2.6.1</b>	<b>Homogeneização</b> .....	101
<b>2.7</b>	<b>BIORREMEDIAÇÃO</b> .....	102
<b>2.8</b>	<b>DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS PARA A BIORREMEDIAÇÃO</b> .....	103
<b>2.8.1</b>	<b>Determinação de pH e temperatura</b> .....	103
<b>2.8.2</b>	<b>Determinação de hidrocarbonetos</b> .....	103
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	103
<b>3.1</b>	<b>Produção do biossurfactante</b> .....	103
<b>3.2</b>	<b>Biorremediação</b> .....	106
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	113
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	114
	<b>CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL</b> .....	119
<b>3.</b>	<b>CONCLUSAO GERAL</b> .....	121
<b>4.</b>	<b>SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS</b> .....	123
	<b>CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	125
	<b>APÊNDICES</b> .....	145
	<b>APÊNDICE 1 – CONCENTRAÇÃO DE HAP</b> .....	146
	<b>APÊNDICE 2 – CARACTERIZAÇÕES FÍSICAS DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO</b> .....	150
	<b>APÊNDICE 3 – LAUDOS TÉCNICOS</b> .....	153
	<b>APÊNDICE 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO</b> .....	155



## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL**



## 1. INTRODUÇÃO

A poluição causada pela exploração, transporte e consumo de petróleo e seus derivados, têm sido um dos principais problemas ao meio ambiente. A produção mundial de óleo cru é de 3 bilhões de toneladas ao ano e metade disto é transportada pelo mar, tornando os mares e oceanos bastante vulneráveis a acidentes com derramamentos (MANTAGNOLI; LOPES; BIDOIA, 2015). O petróleo derramado flutua e alastra-se progressivamente, formando extensas manchas negra, de efeitos altamente destruidores. Além dos seus efeitos imediatos, há também os efeitos a longo prazo, com repercussões não menos graves (DAMAS et al., 2000; NADARAJAH et al., 2002). Devido ao crescente número de casos de vazamento, a descontaminação de solos por hidrocarbonetos derivados de petróleo têm sido alvo de inúmeras pesquisas (GUARINO; SPADA; SCIARRILLO, 2017; SHTRIPLING; KHOLKIN; LARIONOV, 2016; VARJANI, 2017). Pesquisadores tentam remediar esses desastres ambientais com surfactantes químicos, produtos derivados do petróleo, que também possuem elevada toxicidade e tornam o ambiente ainda mais letal (ZHOU et al., 2013).

A utilização de processos naturais e biológicos como remediação de ambientes contaminados com óleos é uma alternativa ambientalmente sustentável e de baixo custo, que vem despertando interesse de pesquisadores. Entretanto, a baixa solubilidade e a hidrofobicidade elevada de muitos hidrocarbonetos os tornam altamente indisponíveis aos micro-organismos, dificultando o deslocamento de substratos insolúveis pela membrana celular. Algumas espécies de micro-organismos são capazes de resolver esse problema a partir da produção de biosurfactantes, compostos constituídos por moléculas anfipáticas que agem pela redução da tensão entre o meio e a parede celular dos micro-organismos, possibilitando sua interação com as moléculas de hidrocarbonetos. A interação do biosurfactante com a superfície celular promove modificações na membrana, aumentando sua hidrofobicidade e facilitando a aderência do hidrocarboneto, o que reduz o índice de lipopolissacarídeos da parede celular sem danificar a membrana. Outra ação desses compostos consiste no aumento da área de contato dos micro-organismos com os hidrocarbonetos, na melhora da mobilidade e acesso ao substrato, resultando no aumento da biodegradação desses compostos (SILVA et al., 2014).

Biosurfactantes comerciais são produzidos por bactérias e fungos (MORITA et al., 2009; SATPUTE et al., 2010; VAN-HAMME et al., 2006), no entanto ainda há um interesse crescente na identificação e isolamento de novos micro-organismos que produzem moléculas de superfície ativa. A este respeito, cianobactérias e microalgas não são exploradas

e são muito promissoras. Estes micro-organismos tornaram-se importante foco de pesquisa e interesse industrial, devido à sua potencial utilização. Atualmente são submetidos a estudos mais detalhados centrando-se frequentemente no conceito de biorrefinaria, que considera a utilização da biomassa ou do resíduo de extração do biocombustível, por exemplo, para obter uma variedade de produtos, principalmente relacionados à alimentação humana e animal, aplicações farmacêuticas e industriais (RADMANN, 2011). Além da potencial aplicação em processos de biorremediação, pela ação dos biossurfactantes produzidos.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG, desde sua criação em 1996, se dedica ao estudo de cultivos de microalgas e processos de fermentação em estado sólido. Diversos estudos já foram realizados com relação à produção de biossurfactante e sua utilização na biorremediação de solos e ambientes aquáticos. Há 20 anos vem desenvolvendo pesquisas voltadas à utilização de subprodutos agroindustriais, abundantes na região, como substratos para a produção de diversos biocompostos, entre eles, os biossurfactantes e sua utilização em biorremediação, demonstrando a sua preocupação com a utilização de resíduos agroindustriais e a redução de impactos ambientais. Nessa linha, já foram desenvolvidas 6 dissertações (de 2004 até 2011) e 2 teses (2011 e 2014), também foram aprovados 8 projetos junto ao CNPq. Além disso, a equipe de pesquisa publicou vários artigos referentes à produção de biossurfactante e sua utilização na biorremediação, em periódicos e eventos no país e exterior, mostrando a relevância do tema para o LEB e para a Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande.

Dentre os trabalhos concluídos, foram selecionadas cepas fúngicas produtoras de surfactantes, estudo da produção de biossurfactante por diferentes fungos em diferentes biorreatores, meios fermentativos, condições físicas de processo, e modelagem e simulação da produção de biossurfactantes. Foi estudada a produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados; produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. Além disso, foi estudada a produção de biossurfactantes por microalgas; produção de biossurfactantes e nanoemulsões a partir da microalga *Spirulina*; cultivo de microalgas para obtenção de biossurfactantes e compostos funcionais (CARVALHO, 2014; CASTIGLIONI, 2006; CERQUEIRA, 2007; COSTA, 2004; HASAN, 1998; MARTINS, 2005; PINTO, 2008; RADMANN, 2011; ZILIO, 2011).

Considerando os resultados promissores sobre a produção de compostos atóxicos e biodegradáveis por micro-organismos, no presente trabalho foi proposto estudar a

remediação de solos contaminados utilizando biossurfactantes produzidos por bactérias e microalgas.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Geral

Estudar a produção e aplicação de biossurfactantes a partir de bactérias e microalgas na biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível.

### 1.1.2. Específicos

- Produzir biossurfactantes a partir das bactérias *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus subtilis* CCT 7678;
- Selecionar microalgas produtoras de biossurfactantes;
- Produzir biossurfactantes a partir de cultivo microalgal;
- Extrair e avaliar os biossurfactantes obtidos;
- Estudar a ação dos biossurfactantes no processo de biorremediação *ex situ* de solos contaminados com hidrocarbonetos.



## **CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FERMENTAÇÃO

A fermentação é uma manifestação fisiológica da célula viva, podendo ser definida como desassimilação (catabolismo da matéria orgânica) de carboidratos, gorduras, proteínas, através de reações acopladas, catalisadas por enzimas intra e extracelulares, acarretando formação de substâncias intermediárias dos produtos finais da oxidação biológica total; ou, então, derivados dessas substâncias. Pode ainda ser definida como uma oxidação incompleta que se manifesta por uma liberação de elétrons, onde uma substância orgânica originária da degradação do substrato, serve de acceptor de elétrons e prótons, que quando ocorre em meio anaeróbio todos os prótons liberados servem para reduzir um substrato orgânico, e em meio aeróbio, parte dos prótons liberados servem para reduzir o oxigênio liberado (REGULY, 1996).

Os micro-organismos obtêm sua energia da oxidação da matéria orgânica, que é fundamentalmente um processo de desidrogenação desta. A queima é um processo gradual e não uma simples oxidação até CO<sub>2</sub>, ocorrendo através de múltiplas etapas ou reações enzimáticas acopladas, cada uma catalisada por enzima distinta, somente os micro-organismos que possuem metabolismo respiratório, isto é que conduz até o oxigênio receptor para formar a água, é que obtém a máxima energia (REGULY, 1996).

Processo fermentativo é um somatório de etapas, onde o meio de fermentação, convenientemente preparado para fornecer ao micro-organismo responsável pelo processo os nutrientes de que necessita, é com frequência esterilizado, com o objetivo de eliminar micro-organismos contaminantes indesejáveis. No fermentador, esse meio recebe o inóculo, suspensão do micro-organismo capaz de garantir a fermentação do meio em condições econômicas. O processo de fermentação é, então, controlado (temperatura, pH, agitação, concentração de nutrientes,) de modo a manter condições favoráveis a atuação do micro-organismo. Quando o processo é aeróbio, há necessidade de fornecer ar ao sistema, ar esse quase sempre esterilizado. Completada a fermentação, o líquido é encaminhado aos tratamentos finais, com vista à separação de produtos e de subprodutos ao tratamento dos resíduos (BORZANI et al., 1975).

Os processos fermentativos são comumente classificados quanto à condução do processo (descontínuos, semicontínuos e contínuos), quanto ao modo de cultivo (processos

em estado sólido e submerso) e quanto ao suprimento de oxigênio (processos aerados e não aerados) (REGULY, 2000).

A fermentação, de um modo geral, se caracteriza pela aplicação do metabolismo microbiano na transformação de uma matéria-prima simples em produtos de maior valor agregado, como por exemplo, ácido cítrico, antibióticos, entre outros (TREVAN et al., 1990 citado por CASTIGLIONI, 2006).

### **2.1.1. Fermentação em estado sólido**

Denomina-se Fermentação em Estado Sólido (FES) aquela em que o desenvolvimento microbiano ocorre em condições de atividade de água baixa (menor que 60%). Sendo assim, apresenta uma série de vantagens, tais como: obtenção de produtos concentrados, necessitando menor quantidade de solvente para extração; possibilidade da exclusão das etapas de concentração e/ou extração; redução dos problemas de contaminação; substratos simples e de baixo custo; a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária; ausência de espuma; eliminação da necessidade de solubilização do substrato; eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação (FERREIRA et al., 2011; SILVEIRA; FURLONG, 2007).

Segundo Pinto et al. (2005) FES apresenta as seguintes características:

- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas;
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais;
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas às dos habitats naturais;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao micro-organismo.

Resíduos agroindustriais são os substratos mais utilizados na FES (PANDEY et al., 2000). A preparação e o pré-tratamento do substrato incluem: redução de tamanho; suplementação com nutrientes (fósforo, nitrogênio, sais), adequação do pH e conteúdo de

umidade e tratamento térmico com vapor para eliminação de possíveis contaminações (HASAN, 1998). Farelos, cascas e bagaços são materiais considerados viáveis para a biotransformação (PINTO et al., 2005).

Muitos micro-organismos são capazes de crescer em substratos sólidos, mas somente fungos filamentosos podem se desenvolver na ausência de água livre. Bactérias e leveduras crescem em substratos sólidos com níveis de 40-70% de umidade, mas o crescimento e a proliferação dos organismos unicelulares sempre requerem água livre (FERREIRA et al., 2011; RAGHAVARAO et al., 2003).

No processo de FES deve-se levar em consideração alguns aspectos importantes, como a seleção do micro-organismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros do processo de isolamento e a purificação do produto, dentre outros fatores (PANDEY, 2003).

Os principais parâmetros que devem ser medidos e controlados na FES são: temperatura, aeração, pH e conteúdo de água (MAUREL et al., 2003).

Dentre os fatores importantes para o crescimento microbiano e atividade no substrato, particularmente o tamanho das partículas (granulometria) e níveis de umidade/atividade de água são pontos críticos. Geralmente, pequenas partículas de substrato fornecem uma grande superfície de contato com o micro-organismo, mas resulta em baixo crescimento. Contrariamente, grandes partículas fornecem maior aeração, mas limitam a superfície de contato para uso microbiano (PANDEY et al., 1999). Portanto o tamanho da partícula deverá ser selecionado de acordo com cada processo em particular.

Estudos demonstram que a umidade do meio de fermentação é um fator determinante no sucesso deste processo, sendo que níveis elevados de umidade causam diminuição da porosidade e dificultam a transferência de oxigênio. No entanto, níveis baixos de umidade do meio diminuem a solubilidade do substrato sólido (MAHADIK et al., 2002).

A aeração forçada no biorreator é utilizada para remoção de calor e também para abastecer a demanda de O<sub>2</sub> e remoção de CO<sub>2</sub>. O uso de ar em excesso elimina o problema da remoção de calor, porém ocasiona diminuição da concentração de biomassa, pois promove a secagem do meio sólido a níveis desfavoráveis de umidade (HASAN, 1998).

Variações no pH resultam do consumo do substrato (ex: hidrólise de proteína) ou na produção de metabólitos (ex: ácidos orgânicos). Esses são indicadores de mudanças na atividade metabólica. Alguns autores sugerem o uso de um eletrodo potenciométrico, ou um eletrodo padrão para medida de pH, depois da suspensão da amostra em água destilada (MAUREL et al., 2003).

Os biorreatores para FES podem ser de vidro, bandejas, esteiras rolantes, coluna e tambor rotativo (MARTINS, 2005). Os biorreatores de coluna são os mais apropriados, pois a aeração forçada permite controle de parâmetros da fermentação através da manipulação da taxa fluida e da temperatura do ar usado na fermentação (SANGSURASAK; MITCHELL, 1995, citados por MITCHELL et al., 2000). Segundo Costa (1996), biorreatores de coluna podem consistir em um tubo de vidro ou de plástico, colocado na vertical e com um leito fixo de substrato, podendo possuir encamisamento externo para controle de temperatura, utilizando circulação de água (Figura 1).

**Figura 1-** Fermentação em biorreatores de coluna.



### **2.1.2. Fermentação submersa**

A fermentação submersa é caracterizada pela utilização de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis. Este processo tem como vantagens a facilidade de controle de parâmetros como aeração, agitação, pH, temperatura e a possibilidade de automação (COUTO; SANROMÁN, 2006). A maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente do processo. Outra limitação é quando o metabólito produzido é extracelular, obtendo-se o composto mais diluído, sendo necessária a inclusão de uma etapa de concentração mais trabalhosa no processo de purificação (ALONSO, 2001).

Esse tipo de fermentação pode ser realizado em frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. Os processos realizados em frascos agitados apresentam dificuldades no controle de certos parâmetros, como por exemplo, a aeração, que é uma variável determinante em alguns casos de produção de enzimas (ALONSO, 2001; MARTINS, 2001).

Existem fermentadores que operam de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. No regime contínuo, há uma constância na entrada de substrato conforme as necessidades do micro-organismo e na saída do meio fermentado. Já os processos descontínuos podem ser realizados na forma de batelada, isto é, quantidades únicas de substrato são fornecidas ao micro-organismo no início de cultivo (LI; CHENG; CHEN, 2004; SHU et al., 2006).

A batelada alimentada consiste em realimentar o processo durante sua execução, visando aumentar a produção, permitindo a exploração de aspectos cinéticos do processo (MARTINS, 2001).

## 2.2. MICROALGAS

Microalgas são micro-organismos fotossintetizantes, procariontes ou eucariontes capazes de crescer sob as mais diferentes condições em ambientes aquáticos ou mesmo terrestres, devido à sua estrutura unicelular ou multicelular simples (SINGH; SHARMA, 2012). Estes micro-organismos crescem em torno de 100 vezes mais rapidamente do que plantas terrestres, podendo dobrar sua biomassa em menos de 24 h, por possuírem estrutura celular simples, também apresentam elevada relação superfície/volume, o que lhes confere altas taxas de assimilação de nutrientes (LAM; LEE; MOHAMED, 2012). Como não produzem celulose para compor elementos estruturais característicos de plantas superiores tais como folhas, caules e raízes, microalgas podem apresentar taxas de crescimento muito mais elevadas do que as culturas terrestres, em alguns casos, podendo atingir uma ordem de magnitude acima destas (YUE; YOU; SNYDER, 2014). Exemplos de micro-organismos procarióticos são cianobactérias (*Cyanophyceae*) e de microalgas eucarióticas, as algas verdes (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*) (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As microalgas procarióticas surgiram há 3500 milhões de anos e foram os primeiros organismos fotossintetizantes capazes de produzir oxigênio, formando a atmosfera terrestre e possibilitando o surgimento de outras formas de vida no planeta (HENRIKSON, 1994; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

No Brasil, pesquisas com microalgas são relativamente recentes e tem focado, principalmente, o aspecto de crescimento sobre diversas condições nutricionais e físico-químicas. No Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), cultivos massivos vêm sendo realizados desde o ano 2000, com a produção de *Spirulina* para enriquecimento de alimentos para a merenda escolar e no ano de 2007

começou, também, a funcionar a planta piloto de cultivo de microalgas para biofixação de CO<sub>2</sub>, instalada na Usina Termelétrica Presidente Médici, operada pela Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE) (RADMANN, 2011).

*Spirulina* é uma das microalgas mais estudada no mundo. Esta microalga se destaca por apresentar alto teor proteico em base seca (51 – 71%), além de ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas, principalmente do complexo B e minerais. Esta microalga possui o certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) da *Food and Drug Administration* (FDA, 2002), e no Brasil é reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005), podendo ser utilizada na alimentação sem oferecer risco à saúde. A microalga *Spirulina* ocorre naturalmente no extremo sul do Brasil (MORAIS et al., 2008).

Culturas de microalgas consomem grandes quantidades de CO<sub>2</sub> (cerca de 2 kg de CO<sub>2</sub> por kg de biomassa de microalgas) e já demonstraram capacidade de fixação de CO<sub>2</sub> de gases de combustão (COSTA, 2008; MORAIS; RADMANN; COSTA, 2011; RADMANN; TREDICI, 2006).

### **2.2.1. Condições de cultivo de microalgas**

O cultivo de microalgas vem sendo cada vez mais difundido no mundo inteiro. Os primeiros estudos sobre microalgas em laboratório começaram no início do século passado. Cultivos massivos começaram em 1960 com *Chlorella* e *Scenedesmus*, no Japão, Alemanha e Estados Unidos. Na Itália, os estudos sobre cultivos massivos de microalgas iniciaram em 1956 no Instituto de Microbiologia Agrária e Técnica da Università degli Studi di Firenze com o Professor Gino Florenzano (TREDICI, 2006).

Como qualquer outro micro-organismo, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. Desta maneira, a manipulação de condições de cultivo, nomeadamente a presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos, alguns de elevado valor comercial. Este fato pela primeira vez referenciado por TAMIYA (1953), que modificou a composição, principalmente no seu teor em lipídios e proteínas, variando as condições de cultivo da microalga.

Em condições de crescimento fototróficas, microalgas absorvem a energia solar e assimilam dióxido de carbono a partir do ar e nutrientes em habitat aquáticos. No entanto, a produção comercial deve aperfeiçoar as condições ideais de crescimento natural. A escolha do

reator é um dos principais fatores que influenciam a produtividade de biomassa de microalgas. Tanques abertos vêm em diferentes formas, tais como *raceway* ou circular (MASOJIDEK; TORZILLO, 2008).

Carbono e nitrogênio são os macronutrientes de maior importância na produção de biossurfactantes. Diversos trabalhos relatam a influência destes macronutrientes, tanto em relação à fonte quanto a concentração destes compostos no meio de cultivo (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; MARTINS et al., 2009).

O fósforo é um nutriente essencial que desempenha um papel importante em processos metabólicos celulares, formando muitos componentes estruturais e funcionais necessários para o crescimento de microalgas, pois participa na transferência de energia intracelular, síntese de ácidos nucléicos e reações especiais associadas com divisão celular (KAPLAN et al., 1990). Markou (2012) verificou que a quantidade de fósforo existente no meio de cultura alterou a composição de biomassa de *Spirulina*, pois a redução de  $K_2HPO_4$  no meio de cultivo causou aumento na concentração de carboidratos e lipídios e redução na concentração de proteínas.

O  $CO_2$  é considerado como nutriente limitante para o cultivo de microalgas, se estiver disponível em baixa concentração no gás de alimentação (quando o ar é utilizado como uma fonte de  $CO_2$ ) ou, quando a mistura não é suficiente. No entanto, a elevada concentração de  $CO_2$  provoca uma redução do pH, o qual pode inibir o crescimento das microalgas (WANG et al., 2012). Tanques abertos podem possuir uma fonte de carbono limitada, devido à baixa transferência de massa, o simples borbulhamento de  $CO_2$  nas culturas podem não ser suficientemente eficaz, porque o tempo de residência da bolha pode ser muito curta e é perdida para a atmosfera. Nestes casos, uma concentração elevada de  $CO_2$  livre deve ser mantida através de injeção direta de gases de combustão de usinas, de cimento, petroquímica e fábricas durante o cultivo. A biofixação de  $CO_2$  pode ser aumentada mantendo um pH alcalino (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011). O sistema mais utilizado para o controle de pH é o tipo de sistema *on-off* em que  $CO_2$  é injetado na cultura quando o pH for superior a um ponto de ajuste predefinido (KUMAR et al., 2010).

A temperatura de um meio de cultivo contendo microalgas varia em escalas diurnas e sazonais, afetando tanto as taxas de fotossíntese quanto as de respiração. A maioria das espécies de microalgas cresce bem em uma temperatura ótima entre 15 e 25 °C. Em temperaturas sub-ótimas, a fotossíntese microalgal satura com menores intensidades de luz, enquanto que em temperaturas supra-ótimas, as taxas de respiração e fotorrespiração aumentam rapidamente. A temperatura afeta também a solubilidade de gases em água,

incluindo O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, bem como o pH do meio (SUTHERLAND et al., 2015). Embora tanques abertos sejam limitados por temperaturas baixas pela manhã, fotobiorreatores geralmente necessitam de resfriamento ao meio-dia. A imersão em um banho de água, pulverização de água ou a utilização de trocadores de calor internos são as soluções mais comuns adotadas para controlar a temperatura no exterior dos fotobiorreatores. Pulverização de água pode ser confiável e de baixo custo em climas secos (TREDICI; RODOLFI, 2004).

Dentre os vários fatores que afetam a produtividade de microalgas, a luz é um dos principais parâmetros a se considerar, uma vez que fornece toda a energia necessária para suportar seu metabolismo. Contudo, quando fornecida em excesso, pode danificar as células, levando a um stress oxidativo e à fotoinibição, reduzindo a eficiência fotossintética (GRIS et al., 2014). A fotoinibição ocorre, quando o fluxo de fótons absorvido nos tilacóides promovem uma concentração de elétrons de alta energia na célula, excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com água e forma peróxido de hidrogênio, tóxico às células (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004). Quando a luz se torna limitante, células de microalgas aumentam a sua concentração de pigmentos de colheita de luz, em particular, a clorofila, a fim de capturar a luz disponível. No entanto, isto pode levar à auto-sombreamento interno, o denominado "efeito de pacote", em que a eficiência de absorção da luz por unidade de clorofila diminui com o aumento do teor de clorofila (SUTHERLAND et al., 2015).

O espectro e intensidade de luz são fatores que afetam diretamente o desempenho do crescimento de microalgas fototróficas, tanto interiores como exteriores. Nas culturas ao ar livre, luz solar é a principal fonte de energia, ao passo que as inovações em iluminação artificial, tais como emissores de luz diodos (LED) e fibra óptica, são interessantes para os sistemas de cultivo interior. Nas culturas cobertas, o maior desafio é o alto custo da iluminação artificial (CHEN et al., 2011).

Independentemente da fonte de luz, o seu uso por microalgas ocorre da mesma maneira. Em um sistema fotossintético, 8 fótons de radiação são necessários para fixar uma molécula de CO<sub>2</sub>, sob a forma de hidratos de carbono, o que resulta em eficiência máxima do fotossistema (CHINI-ZITTELLI et al., 2006).

Outro fator importante no cultivo das microalgas é a agitação, a qual pode influenciar o crescimento celular. A agitação tem por finalidade impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células, permitir a captação de CO<sub>2</sub> da atmosfera, facilitar a transferência de O<sub>2</sub> da fase gasosa para o meio

líquido e diminuir os gradientes gasosos no meio (GRIMA et al., 1996; JIMENEZ et al., 2003).

### 2.3. SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS

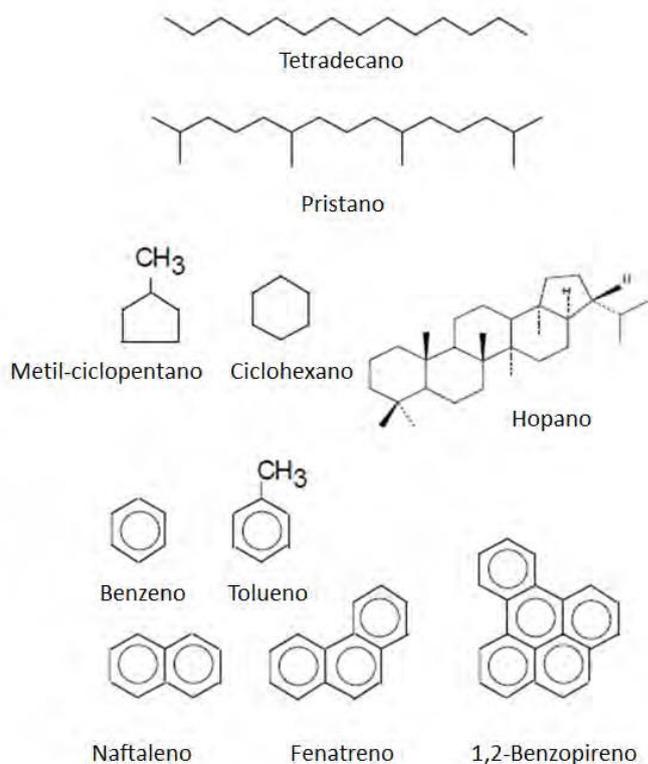
O petróleo e todos seus derivados são compostos principalmente de hidrocarbonetos. A exploração, transporte e consumo do petróleo e seus derivados causa a liberação dos hidrocarbonetos no ambiente. Essa liberação pode ocorrer em menores quantidades pelo descarte inadequado ou infiltrações nos sistemas de armazenamento, ou em grande escala por derramamentos acidentais nos navios petroleiros, plataformas de petróleo e dutos (MONTAGNOLI; LOPES; BIDOIA, 2015).

A poluição causada por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ao meio ambiente. Quando ocorre o derramamento de gasolina em solos, por exemplo, uma das principais preocupações é a contaminação das águas subterrâneas, que também podem contaminar, especialmente, os aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano (CUSTANCE et al., 1992).

Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, alguns contaminantes se destacam frente aos demais. De forma geral, os compostos que exigem maior preocupação ambiental e que, normalmente, são identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação, são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (isômeros: *orto-*, *meta-* e *para-*xileno). Esses compostos, conhecidos também como BTEX, são definidos como hidrocarbonetos monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico. Os compostos BTEX são usados, principalmente, em solventes e em combustíveis e são os constituintes mais solúveis na fração da gasolina (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Na Figura 2 é apresentada os principais hidrocarbonetos presentes no petróleo.

A produção mundial de óleo cru é de mais de 3 bilhões de toneladas ao ano e metade disso é transportada pelo mar, tornando os mares e oceanos bastante vulneráveis a acidentes com derramamentos. Acidentes com navios são geralmente exemplificados pelo desastre ocorrido com o Exxon Valdez no Alasca, por ter afetado seriamente toda a biota marinha e costeira da região. A extração de petróleo em plataformas marítimas são também fontes de contaminação. Estima-se que mais de 2 milhões de toneladas de petróleo por ano são perdidas pela indústria no mar (MONTAGNOLI; LOPES; BIDOIA, 2015).

**Figura 2-** Hidrocarbonetos representativos na composição do petróleo.



Fonte: HARAYAMA (1999).

Entre os acidentes com petróleo têm-se o derrame de meio milhão de litros de combustível em janeiro de 2001 nas Ilhas Galápagos; o derrame de 4 milhões de litros de petróleo da Refinaria Getúlio Vargas no município de Araucária – PR, em julho de 2000; e o vazamento de 1,3 milhões de litros de combustível em janeiro do mesmo ano na Baía de Guanabara, RJ (MONTAGNOLI, 2011). Diante disso, torna-se urgente o desenvolvimento de tecnologias para diminuir o impacto ambiental ocasionado por esses acidentes.

O petróleo derramado flutua e alastra-se progressivamente, formando extensas manchas negras de efeitos destruidores. Além dos seus efeitos imediatos e bem evidentes, há também os efeitos em longo prazo, com repercussões não menos graves. Quando as marés negras atingem as zonas costeiras colocam em risco a fauna e flora pela intoxicação de peixes, moluscos e mamíferos, representando um perigo para o homem através da cadeia alimentar. Há também consequências econômicas e sociais, com prejuízos à atividade pesqueira e à atividade turística, já que os resíduos petrolíferos impedem por muito tempo a utilização das praias (JIANG et al., 2010; STARK et al., 2003).

Os problemas ambientais associados ao petróleo e derivados também surgem do descarte e estocagem inadequados (TAM; BYER, 2002). Em postos de combustíveis, os hidrocarbonetos são, frequentemente, liberados acidentalmente no ambiente devido ao abastecimento descuidado ou pela falta de manutenção (associada com a baixa fiscalização) dos tanques subterrâneos. A recomendação para perdas durante o abastecimento é a contenção do líquido por canaletas instaladas nos postos. O problema torna-se mais sério com relação aos vazamentos de tanques subterrâneos, em que a perda é pequena, porém contínua e prolongada, causando contaminação da água subterrânea (JACQUES et al., 2007; RAHMAN et al., 2002).

No Brasil, somente o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos hidrocarbonetos (JACQUES et al., 2007). Na Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009, o naftaleno apresenta um valor de referência de  $0,12 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que significa que, em concentrações iguais ou menores a esta, o solo pode ser considerado “limpo” e possível de ser utilizado para qualquer finalidade. O valor de intervenção indica que há riscos para a saúde humana e para o ambiente, sendo que a ultrapassagem desse valor em um volume de solo de  $25 \text{ m}^3$  ou em  $100 \text{ m}^3$  de água subterrânea impõem a necessidade de implementação na área avaliada de ações voltadas para a sua remediação. Para o naftaleno, o valor de intervenção é de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos agrícolas, de  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos residenciais e de  $90 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos industriais. Na água subterrânea, o valor de intervenção para este hidrocarboneto é de  $140 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (CONAMA, 2009). Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre hidrocarbonetos está principalmente nos Estados Unidos, sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), e na União Europeia, através da Comissão das Comunidades Europeias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, a qual é utilizada por alguns órgãos ambientais brasileiros (JACQUES et al., 2007).

#### 2.4. REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS

A poluição ambiental provocada por óleos e derivados de petróleo é um problema que atinge proporções mundiais e, a cada ano, aumenta drasticamente, devido ao desenvolvimento dos centros urbanos e, sobretudo a partir da Revolução Industrial, decorrente da geração de resíduos sólidos, efluentes químicos e compostos voláteis (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SOUZA et al., 2016).

A produção de petróleo é conduzida em três estágios: primário, secundário e terciário. A produção primária baseia-se na utilização da pressão interna natural do reservatório. Quando a pressão diminui a ponto de provocar uma queda ou mesmo de cessar a produção de óleo, aplica-se o método de recuperação secundária, que utiliza a injeção de água para elevar a pressão interna e forçar a saída do óleo. Esses dois métodos de extração de petróleo geram um fator médio de recuperação entre 20 a 30 % (OLIVEIRA et al., 2014). O fator de recuperação pode ser elevado com a aplicação de métodos de recuperação terciária. A produção terciária de petróleo, também denominada como recuperação avançada de petróleo (EOR), envolve a aplicação de energia térmica e/ou química com a finalidade de aumentar o fator de recuperação e a vida útil das jazidas de petróleo (BACHMANN et al., 2014).

Vários processos de recuperação avançada de óleo residual são atualmente empregados em todo o mundo: química, física e mecânica (AL-SULAIMANI et al., 2011). Estes processos são bem sucedidos, porém o custo é muito elevado, assim como prejudiciais ao meio ambiente (AL-WAHAIBI et al., 2014). Há uma necessidade de recuperação do petróleo de forma sustentável e mais eficiente. A alternativa é um processo de recuperação avançada de petróleo, empregando micro-organismos, também conhecido como *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR) (AL-WAHAIBI et al., 2014; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008).

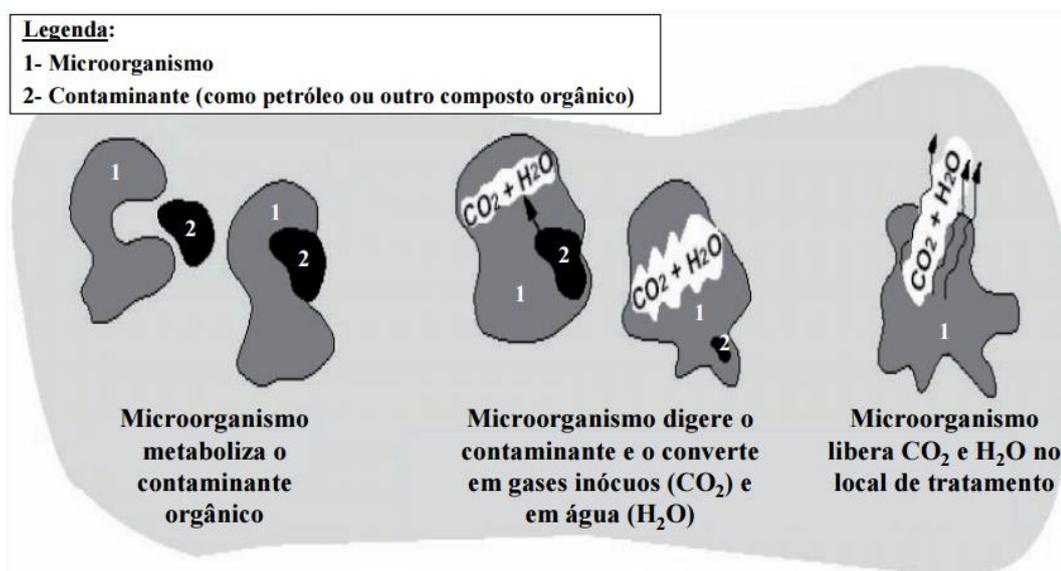
#### **2.4.1. Biorremediação**

Biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos presentes ou adicionados no local de contaminação. Destes, as bactérias são as mais empregadas e, por conseguinte, são consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. O objetivo principal da biorremediação é a mineralização completa dos contaminantes, transformando-os em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade, como CO<sub>2</sub> e água. (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Na Figura 3 é apresentado um esquema geral e simplificado da ação dos micro-organismos em processos de biorremediação.

A aplicação de tecnologias de biorremediação foi introduzida na década de 80 como uma alternativa às metodologias convencionais que envolviam escavação, aterro, bombeamento, tratamento e adição de materiais adsorventes. Além disso, a biorremediação é considerada pela literatura como um método simples e mais seguro (KARHU et al., 2009).

A primeira tentativa expressiva de limpeza do litoral poluído pelo aumento da atividade microbiana foi feita em 1989, após o derrame do Exxon Valdez. A alternativa foi proposta após o tratamento físico pela lavagem com água em alta pressão. Nutrientes foram aplicados nas praias poluídas para acelerar o crescimento e atividade da microbiota local. Duas a três semanas mais tarde, as praias que tinham sido tratados com nutrientes tornaram-se significativamente mais limpas do que os da área controle, sem adição de nutrientes (PRITCHARD; COSTA, 1991).

**Figura 3-** Esquema da ação dos micro-organismos em processos de biorremediação.



Fonte: EPA (2001).

Desde a década de 1950, vêm sendo isoladas bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros (MUTNURI; VASUDEVAN; KAESTNER, 2005; JACQUES et al., 2005; JACQUES et al., 2007) e vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium* entre outros (CERNIGLIA, 1997; JACQUES et al., 2005). No entanto, nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que, comparativamente às culturas puras, têm-se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos. Estes consórcios apresentam maior capacidade de utilização de um grande número de hidrocarbonetos como fonte de C e, principalmente, podem mineralizar

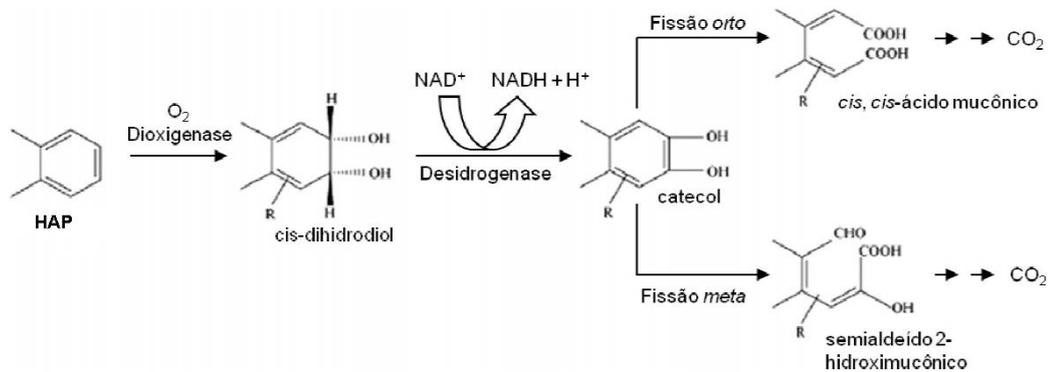
completamente estes compostos, devido à complementaridade metabólica entre os membros do consórcio, em que os hidrocarbonetos seriam transformados em CO<sub>2</sub> e água através da ação de mais de um micro-organismo (JACQUES et al., 2007).

Cerniglia, Gibson e Baalen (1980) observaram que 9 cianobactérias (*Oscillatoria* sp. JCM, *Oscillatoria* sp. MEV, *Microcoleus chthonoplastes* BA-1, *Anabaena* sp. CA, *Anabaena* sp. 1F, *Agmenellum quadruplicatum* PR-6, *Coccochloris elabens* 17a, *Nostoc* sp. MAC, e *Aphanocapsa* sp. 6714), 5 algas verdes (*Chlorella sorokiniana* TX 71105, *Chlorella autotrophica* 580, *Dunaliella tertiolecta* DUN, *Chlamydomonas angulosa* e *Ulva fasciata*), 1 alga vermelha (*Porphyridium cruentum*) e 1 alga marrom (*Petalonia fascia*) eram capazes de oxidar naftaleno.

O metabolismo de xenobióticos pode ser dividido em dois grupos de reações: fase I e fase II. A fase I inclui reações de oxidação, redução e hidrólise, denominada reações de funcionalização, por introduzir um grupo funcional na molécula que está sendo biotransformada (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>). Essas reações são catalisadas por monoaminoxidases, flavinas e monoxigenases citocromo P450. A molécula biotransformada torna-se mais hidrofílica, podendo ser bioinativada ou apresentar-se mais ou menos reativa que a substância precursora. Na fase II podem ocorrer reações de conjugação entre o grupo polar do xenobiótico bioconvertido e substâncias endógenas (metabólito conjugado). Isso geralmente aumenta a solubilidade do metabólito em água, favorecendo sua eliminação da célula (AZERAD, 1999; THOMAS, 2003; TRACY 1995).

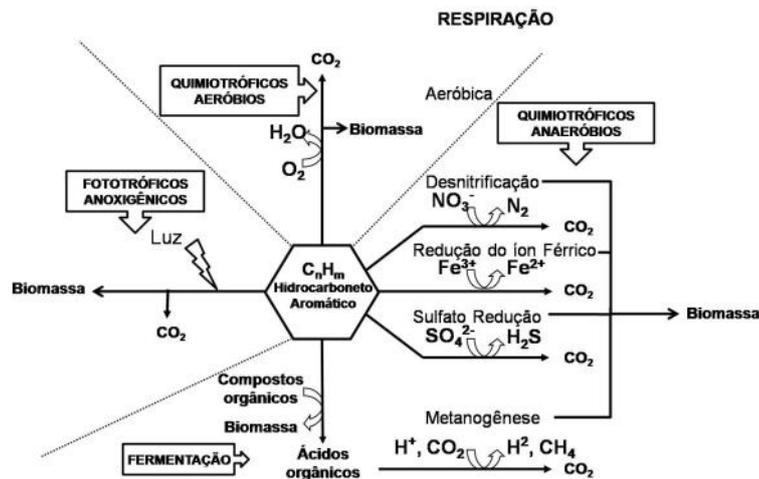
Sabe-se que os hidrocarbonetos podem ser degradados através de duas vias metabólicas: respiração aeróbia e respiração anaeróbia. Na via aeróbia, a primeira etapa da biodegradação consiste na oxidação do hidrocarboneto, que é promovida por enzimas oxigenases. Nesta via, o oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons e os produtos finais são, principalmente, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Figura 4). Se houver incorporação de uma molécula de oxigênio, a enzima monoxigenase é a responsável pelo agir em substituintes metil; esta possivelmente, é a via de degradação do tolueno e dos xilenos. Se houver incorporação de duas moléculas de oxigênio, a reação ocorre devido à dioxigenase, em que anéis aromáticos são rompidos, sendo o benzeno, provavelmente, degradado por essa via metabólica (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; RATLEDGE, 1994).

**Figura 4-** Via de degradação aeróbia de hidrocarbonetos poliaromáticos



Fonte: Adaptado de HARITASH e KAUSHIK (2009).

**Figura 5 -** Degradação de hidrocarbonetos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração



Fonte: TONINI; REZENDE; GRATIVOL (2010).

Alguns autores sugerem que a estratégia utilizada por micro-organismos anaeróbios para quebrar anéis aromáticos é a hidrogenação reductiva do anel, na qual primeiramente, o composto aromático é transformado em um intermediário central (como benzoil-CoA), em seguida o anel é reduzido e finalmente clivado por hidrólise (BERRY et al., 1987; EVANS, 1977; HEIDER; FUCHS, 1997). Outros autores sugerem que a carboxilação e não a hidrogenação, seja o passo inicial na biodegradação de HAP em condições anaeróbias (ZHANG; YOUNG, 1997). Coates et al. (1997) demonstraram que uma grande variedade de hidrocarbonetos podem ser degradados por micro-organismos sob condições redutoras de sulfato em sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, e sugerem que pode ser possível

usar a redução de sulfato, invés da respiração aeróbia, para o tratamento de sedimentos contaminados (Figura 5).

#### 2.4.2. Técnicas de biorremediação de solos

As pesquisas sobre processos microbiológicos de recuperação avançada de petróleo (MEOR) apresentam dois níveis distintos: em escala laboratorial e experimentos de campo. No laboratório, micro-organismos promissores são isolados e selecionados quanto à produção de metabólitos desejáveis para mobilização do óleo. Esses micro-organismos são então, utilizados em experimentos de bancada para demonstração de que o óleo pode ser removido de sistemas porosos saturados. Nos experimentos de campo, micro-organismos selecionados são injetados com nutrientes capazes de suportar o seu crescimento e a produção de metabólitos considerados úteis para liberar o óleo aprisionado (OLIVEIRA et al., 2014).

A degradação dos hidrocarbonetos no solo pode ser limitada pela incapacidade dos micro-organismos em metabolizar eficientemente esses compostos, pela limitação de nutrientes à microbiota degradadora, em virtude destes estarem adsorvidos a fase sólida mineral e orgânica do solo (JOHNSEN; WICK; HARMS, 2005). Para superar estas limitações e promover eficiente remoção dos contaminantes do ambiente, podem-se utilizar técnicas de biorremediação *in situ* (biorremediação realizada no próprio local contaminado), como atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, fitorremediação e *landfarming*, ou técnicas de biorremediação *ex situ* (biorremediação realizada em outro local), como compostagem e biorreatores (AL-WAHAIBI et al., 2014; ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; JACQUES et al., 2007; MCINERNEY et al., 1999; PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008).

Seja o mecanismo *in situ* ou *ex situ*, a tecnologia MEOR lança mão dos produtos do metabolismo microbiano, a fim de que estes ajam sobre o óleo e aumentem a mobilidade do óleo e, conseqüentemente, o fator de recuperação (OLIVEIRA et al., 2014).

##### 2.4.2.1. Biorremediação *In-situ*

A técnica de biorremediação *in situ* é considerada alternativa promissora ao utilizar micro-organismos para reduzir a concentração de determinados poluentes. A compreensão da importância desse processo é grande em casos como derramamentos de

produtos como o petróleo no mar ou rios, além de fornecer melhores alternativas no descarte de produtos potencialmente poluentes (ROSA; TRIGUIS, 2007).

Uma das técnicas *in situ* é a biorremediação passiva ou intrínseca, também denominada atenuação natural, na qual o contaminante permanece no local e, através de processos naturais como biodegradação, volatilização, diluição e sorção, ocorrem a descontaminação do ambiente (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; MULLIGAN; YONG, 2004). Por depender exclusivamente destes processos naturais, a biorremediação passiva pode ser muito lenta, exigindo o uso conjunto de outras técnicas e obrigatoriamente, o monitoramento do local por longo período, visando a proteção do homem e do ambiente. BENTO et al., (2005) conduziram um experimento por 84 dias, no qual a biorremediação passiva reduziu em 47% a concentração de hidrocarbonetos no solo ( $12,250 \text{ g kg}^{-1}$ ). Já a contaminação de querosene tem sido rapidamente eliminada pela biorremediação passiva devido à alta volatilidade deste combustível (DROR; GERSTL; YARON, 2001).

A baixa taxa de degradação de um contaminante no solo pode ser resultado do número reduzido ou inexistente de micro-organismos com habilidade de degradação do composto. Assim, a bioaugmentação, que é a inoculação de um local contaminado com micro-organismos com potencial de degradação dos contaminantes, torna-se uma prática recomendada. Outra técnica *in situ* que pode ser utilizada é a bioestimulação, em que nutrientes orgânicos e inorgânicos podem ser adicionados ao solo visando estimular a atividade dos micro-organismos degradadores (JACQUES et al., 2007).

A biorremediação pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e a atividade dos micro-organismos degradadores. Assim, a temperatura, umidade, pH, pressão, salinidade, porosidade e permeabilidade das rochas, densidade do óleo, disponibilidade de nutrientes e a concentração de oxigênio são os principais fatores a serem considerados. Logo, o processo só deve ser aplicado com prévio conhecimento das características do local (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Alexander (1977) discutiu em detalhes, os efeitos desses fatores sobre os micro-organismos. Para este autor, a atividade microbiológica é influenciada principalmente, pelo pH e pela temperatura dos solos.

Para aplicação *in situ*, micro-organismos anaeróbios facultativos são preferidos. A injeção dos micro-organismos é feita em solução aquosa, o que requer tolerância a oxigênio e a capacidade de fermentar ou de utilizar outro aceptor final de elétrons na sua ausência (CLEMENT et al., 1997).

Soudmand-Asli et al. (2007) investigaram o potencial uso de *Bacillus subtilis* PTCC 1365 e *Leuconostoc mesenteroides* PTCC 1059 para MEOR *in situ* em um meio poroso fraturado. Os resultados mostraram que ambas as bactérias foram capazes de degradar o óleo em uma faixa de 10 a 40 %. Yakimov et al., (1997) testou *B. licheniformis* BNP 29 para MEOR *in situ*, obtendo uma eficiência de 9,3 a 22,1 % de degradação do óleo.

#### 2.4.2.2. Biorremediação *Ex-situ*

*Landfarmeng* é uma técnica *ex situ* que pode ser utilizada para o tratamento do solo contaminado com hidrocarbonetos, sendo este normalmente removido do local de origem e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Neste solo, é desencadeado um processo em que os micro-organismos aeróbios degradam os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO<sub>2</sub> e água (AHTIAINEN; JARVINEN; JOUTTI, 2002).

Outra técnica *ex situ* que pode ser realizada para biorremediação de solos contaminados com altas concentrações de hidrocarbonetos, é o uso de biorreatores. Existe uma infinidade de tipos e configurações de biorreatores que ilustrativamente podem ser comparados a tanques aéreos fechados. O solo contaminado é misturado com água, de modo a formar uma suspensão com 10 a 40 % de sólidos, que é mecanicamente aerada através de agitação. A formação desta suspensão no interior do biorreator possibilita o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo, duas grandes limitações da biorremediação *in situ* (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; MACLEOD; DAUGULIS, 2005). Além disto, no interior do biorreator, as condições ambientais de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são otimizadas para o máximo crescimento microbiano, sendo possível também a inoculação de micro-organismos comprovadamente degradadores dos contaminantes. Após a concentração dos contaminantes ter sido reduzida aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator (JACQUES et al., 2007).

Das e Mukherjee (2007) realizaram estudos de MEOR *ex situ* com duas cepas de *B. subtilis* (DM-03 e DM-04), utilizando uma coluna preenchida com areia e descobriram que ambas as cepas foram eficazes na degradação de petróleo.

A maior limitação desta técnica está relacionada a remoção do solo contaminado, tendo em vista que o processo de tratamento ocorre longe de onde ocorreu a contaminação. Neste caso, apesar de possibilitar a eliminação dos principais focos de contaminação na zona não-saturada, essa prática deve ser realizada com cautela, pois pode propiciar a intensificação do risco às vias de exposição humana, como a inalação de vapores e de materiais particulados contaminados, durante a escavação, o armazenamento, o transporte e a redistribuição dos solos contaminados (EPA, 2004).

## 2.5. BIOSURFACTANTES

Os surfactantes são constituídos por uma porção hidrofóbica e um grupo hidrofílico, que reduzem a energia livre por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface, diminuindo assim, a tensão superficial e interfacial dos líquidos (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2014). A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, o aumento da preocupação ambiental combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes biológicos em decorrência de serem biodegradáveis, diminuindo, assim, o impacto ambiental (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008).

Os biosurfactantes podem ser produzidos por micro-organismos, plantas e animais (AL-WAHAIBI et al., 2014; LIU et al., 2015). Possuem aplicações potenciais em diferentes setores industriais como formulações farmacêuticas e cosméticas, petroquímica, médica, produtos alimentícios e nas áreas de proteção ao meio ambiente. Ainda, há uma ampla possibilidade de mercado para os biosurfactantes como, por exemplo, a indústria de petróleo para biorremediação/dispersão, tanto no solo quanto no mar, durante os derramamentos de óleo; remoção/mobilização de óleos incrustados em tanques de estocagem, rochas e areia do mar, aumentando a sua degradação (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; RADMANN et al., 2015).

A estrutura dos biosurfactantes apresenta diversas combinações, principalmente aqueles produzidos por micro-organismos na presença de hidrocarbonetos. A maioria dos biosurfactantes são lipídios, os quais apresentam uma estrutura típica de surfactante. A porção lipofílica, normalmente é um hidrocarboneto com um ou mais ácidos graxos, os quais podem ser saturados, insaturados ou conter estruturas cíclicas. Já a porção polar pode ser simples (carbonila, hidroxila) ou uma mistura complexa de fosfatos, carboidratos,

aminoácidos, entre outros (LANG, 2002; SMYTH et al., 2010). Vários tipos de biossurfactantes, a sua estrutura e aplicações são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Biossurfactantes, organismos produtores e suas aplicações

<b>Organismo</b>	<b>Tipo de biossurfactante</b>	<b>Aplicações potenciais</b>
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9	Glicolipídio	Operações de limpeza do derramamento de petróleo.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S2	Ramnolipídio	Biorremediação de solos contaminados com petróleo.
<i>Pseudomonas libanensis</i> M9-3	Lipopeptídeo	Aplicações ambientais e biomédicas.
<i>Bacillus subtilis</i> ZW-3	Lipopeptídeo	Potencial farmacêutico, proteção ambiental, estética e recuperação de petróleo.
<i>R. wratislaviensis</i> BN38	Glicolipídio	Biorremediação.
<i>Bacillus subtilis</i> BS5	Lipopeptídeo	Biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS20	Ramnolipídio	Biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos.
<i>Micrococcus luteus</i> BN56	Trealose tetraéster	Biorremediação de ambientes contaminados com óleo.
<i>Bacillus subtilis</i> HOB2	Lipopeptídeo	Recuperação avançada de petróleo, biorremediação de solos e ambientes marinhos e indústria e alimentos.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	Ramnolipídio	Biorremediação.
<i>Nocardiosis alba</i> MSA10	Lipopeptídeo	Biorremediação.
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Ramnolipídio	Aplicações ambientais.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BD5	Lipopeptídeo	Biorremediação e biomedicina.
<i>Candida bombicola</i>	Soforolipídios	Aplicações ambientais.
<i>Brevibacterium aureum</i> MSA13	Glicolipídio	Recuperação avançada de petróleo.
<i>Bacillus velezensis</i> H3	Lipopeptídeo	Cepa industrial para produção de lipopeptídeo.
<i>Burkholderia plantari</i> DSM 9509	Ramnolipídio	Detergentes e indústria farmacêutica.

Fonte: MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT (2011).

Harvey et al. (1990) testaram o uso de biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* para remoção da contaminação por óleo no acidente com o Exxon Valdez no Alasca. Os autores observaram que amostras contendo uma solução contendo 1 % do biossurfactante tiveram uma remoção do óleo por micro-organismos três vezes mais eficiente do que ensaios controle contendo água. Tais resultados demonstram a habilidade dos biossurfactantes na remoção de poluentes ambientais oleosos, atuando como facilitadores da captação desses substratos pelos micro-organismos. Os biossurfactantes têm como função, formar micro emulsões e micelas, nos quais os hidrocarbonetos podem solubilizar-se em água (ou a água se solubilizar em hidrocarbonetos). Os parâmetros utilizados para medir a eficiência dos biossurfactantes são: redução da tensão superficial, redução da tensão interfacial, emulsificação e concentração micelar crítica (CMC) (DESAI; BANAT, 1997).

A eficiência e a efetividade são características essenciais ao determinar a qualidade de um biossurfactante. A eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 200 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que a efetividade é determinada pela capacidade de reduzir a tensão superficial, a qual é mensurada através da energia livre por unidade de área requerida para trazer a molécula do seio da fase líquida para a superfície (GOUVEIA et al., 2003). Devido à presença do biossurfactante, menos trabalho é requerido a fim de trazer a molécula para a superfície e a tensão é reduzida. Para ser considerado um bom biossurfactante, a tensão superficial da água deve diminuir de 72 para 35 mN m<sup>-1</sup> (MULLIGAN, 2005).

Em relação aos surfactantes sintetizados quimicamente, biossurfactantes têm várias vantagens: baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e salinidade, maior compatibilidade ambiental e síntese a partir de matérias-primas renováveis (AL-WAHAIBI et al., 2014; CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2014; LIU et al., 2015; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008). No entanto existem algumas limitações que impedem sua aplicação em grande escala, principalmente devido a menor disponibilidade em relação aos agentes tenso-ativos químicos (AL-WAHAIBI et al., 2014; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Porém, Torres et al. (2011) relataram a descoberta de novos biossurfactantes e o desenvolvimento de novos processos de fermentação e recuperação.

Atualmente a disponibilidade de grandes quantidades de biossurfactantes comerciais é limitada (exceto ramnolipídios), porém o custo para produção em escala industrial ainda é elevado (AL-WAHAIBI et al., 2014). Vários pesquisadores têm sugerido a aplicação de métodos estatísticos ou a utilização de subprodutos agroindustriais para reduzir o custo de produção (AL-BAHRY et al., 2013; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Geralmente, biossurfactantes de baixa massa molar são bem conhecidos por reduzir a tensão superficial e tensão interfacial entre óleo e água, aumentando assim, a recuperação do petróleo, enquanto que biossurfactantes de alta massa molar são conhecidos por suas propriedades emulsificantes, aumentando assim a mobilidade e recuperação do petróleo pesado (AL-WAHAIBI et al., 2014). Os biossurfactantes de baixa massa molar são geralmente glicolípídios ou lipopeptídeos, os de alta massa molar podem ser polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexo de biossurfactantes (LEVISAUSKAS et al., 2004).

### **2.5.1. Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes**

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (BANAT, 1995).

#### **2.5.1.1. Fonte de carbono**

A maioria das bactérias são heterotróficas, obtendo energia a partir de fontes orgânicas de carbono. Destas, as mais comuns são os carboidratos, particularmente D-glicose, aminoácidos, ácidos carboxílicos, lipídios, álcoois e até mesmo polímeros como amido e celulose. Na realidade, qualquer composto orgânico e muitos sintéticos podem ser utilizados por algum micro-organismo (SCHMIDELL et al., 2001).

A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa microalgal. A fonte de carbono utilizada no processo fotossintético das microalgas é o bicarbonato de sódio e/ou dióxido de carbono. Além disso, muitas microalgas podem crescer heterotroficamente durante o período escuro utilizando fontes orgânicas de carbono (WEN; CHEN, 2003). Quando as células são expostas à luz, muitas microalgas podem assimilar carbono inorgânico e orgânico simultaneamente, desenvolvendo metabolismo mixotrófico (POERSCHMANN et al., 2004).

A influência da fonte de carbono na produção de biossurfactante por diferentes cepas de micro-organismos tem sido bastante estudada. A literatura aponta diversidade entre

as fontes de carbono. Pareilleux (1979) isolou compostos tensoativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo n-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose a levedura não produziu nenhum bioemulsificante. Em um estudo similar, Zinjarde e Pant (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não foi viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C<sub>10</sub> – C<sub>18</sub>) detectou-se a produção de bioemulsificante.

Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (HOMMEL et al., 1994; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009). Alguns trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura.

Costa (2004) verificou a produção de biossurfactantes pelo fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* por fermentação em estado sólido. Farelo de arroz desengordurado foi utilizado como fonte de nutrientes, com fontes adicionais de carbono de origem fóssil (ciclohexano, n-hexano e óleo diesel) e não fósseis (glicerina e óleo de soja). Melhores respostas de atividade emulsificante foram obtidas quando foram utilizadas fontes de carbono de origem fóssil nos cultivos.

Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante (WEBER et al., 1992).

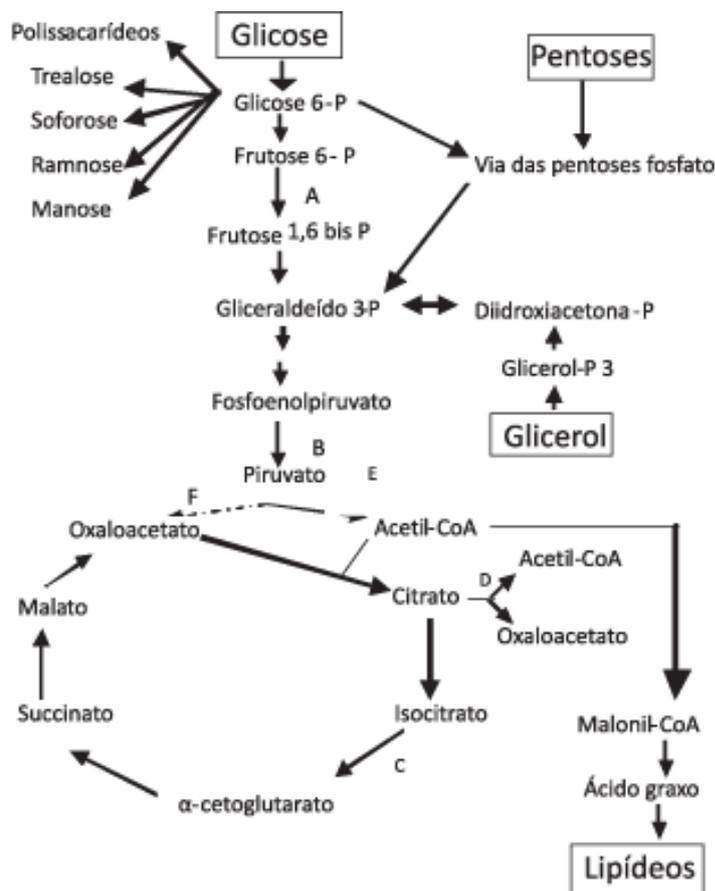
A utilização industrial dos biossurfactantes tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados ao uso de substratos de custo elevado. Porém, estes custos podem ser significativamente reduzidos, pelo uso de fontes alternativas de nutrientes de baixo custo bem como a obtenção de altos rendimentos em produtos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). O uso de subprodutos industriais, além de diminuir os custos de produção, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados ao meio ambiente (MANEERAT, 2005).

Mercade et al. (1993) foram os primeiros pesquisadores que mostraram a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* 47T2 quando cultivada em efluentes de azeite de oliva como única fonte de carbono. Este estudo foi importante para demonstrar a possibilidade de utilizar outros resíduos lipofílicos.

Thanomsub et al. (2004) utilizaram como fonte de carbono óleo de soja queimado, proveniente da fritura, para produção de um biossurfactante glicolípido a partir de *Candida ishwadae*. Este surfactante exibiu alta atividade de emulsificação, com dose ativa mínima de  $1,25 \mu \text{g}^{-1}$ .

Pornsunthorntawee et al. (2008) estudaram a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* PT2 e *Pseudomonas aeruginosa* SP4, utilizando meio de cultivo contendo óleo de palma como fonte de carbono. A maior produção de biomassa foi alcançada em 48 h e os biotensoativos produzidos apresentaram boa atividade de superfície, com 26,4 e 28,3  $\text{mN m}^{-1}$ , respectivamente. Em estudo comparativo com três surfactantes sintéticos, os biotensoativos apresentaram melhor eficiência na degradação de óleo.

**Figura 6** - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactantes a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: fosfofrutoquinase (A), piruvato quinase (B), isocitrato desidrogenase (C), citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos) (D), piruvato desidrogenase (E) e piruvato carboxilase (F).



FONTE: Syldatk; Wagner (1987).

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolípido, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas (formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano (SYLDATK; WAGNER, 1987) como mostra a Figura 6.

O substrato hidrofílico utilizado, como por exemplo, a glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante (Figura 6). Para a produção de lipídeos a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (SYLDATK; WAGNER, 1987).

Por outro lado, quando um hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de precursores diferentes das hexoses) podendo, desta forma, ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos. Para a produção dos sacarídeos a via da gliconeogênese é ativada, que consiste na oxidação dos ácidos graxos via  $\beta$ -oxidação a acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação do acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores do polissacarídeo, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. Entretanto, as reações catalisadas pela piruvato quinase e fosfofrutoquinase-1 são irreversíveis; desta forma, outras enzimas, as quais são exclusivas para gliconeogênese, são requeridas para contornar tais reações (SYLDATK; WAGNER, 1987). As principais reações são apresentadas na Figura 7, até a formação da glicose 6-fosfato que é a principal precursora dos polissacarídeos, dissacarídeos a serem formados para produção da porção hidrofílica dos glicolípídeos.

#### 2.5.1.2. Fonte de nitrogênio

O nitrogênio é essencial para o crescimento celular dos micro-organismos, sendo importante para a síntese de proteínas e enzimas. Diferentes compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de biossurfactantes, tais como ureia (VANCE-HARROP;



crescimento de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. Assim, a adição destes elementos estimula a biodegradação do petróleo (CHAINEAU et al., 2005).

Abouseoud et al. (2008), em estudo realizado com *Pseudomonas fluorescens*, em que utilizaram três fontes de nitrogênio (cloreto de amônio, nitrato de amônio e nitrato de sódio), verificaram que os melhores resultados na produção de biossurfactantes e no crescimento foram obtidos quando foi utilizado nitrato de amônio.

Carvalho, Oliveira e Costa (2014) utilizando microalgas para produção de biossurfactantes, verificaram que a concentração mais elevada de nitrogênio no meio de cultivo, favoreceu a produção do bioemulsificante, porém, sem adição de fósforo.

Segundo Benincasa et al. (2002), a produção de biossurfactantes pelo micro-organismo ocorre após o consumo total de nitrogênio, aumentando a produção após a fase exponencial de crescimento.

Um parâmetro bastante estudado pelos pesquisadores é a relação quantitativa entre as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de biossurfactantes. O efeito de diferentes relações C/N na produção do bioemulsificante produzido por *Rhodotorula glutinis* foi avaliado, utilizando diferentes hidrocarbonetos. A atividade de emulsificação aumentou com o aumento da relação C/N na maioria dos casos, sendo esse aumento observado em condições limitantes de nitrogênio (SINGH et al., 1990).

A utilização de melação como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, por *Pseudomonas aeruginosa* GS3 foi avaliada por Patel e Desai (1997). A linhagem mostrou-se capaz de utilizar essas fontes renováveis e relativamente de baixo custo, para a produção de biossurfactante, sem adição de nutrientes. Utilizando-se 7 % (v v<sup>-1</sup>) de melação e 0,5 % (v v<sup>-1</sup>) de água de maceração de milho, obteve-se 0,24 g L<sup>-1</sup> de ramnose após 96 h de incubação. A tensão interfacial do petróleo foi reduzida de 21 para 0,47 mN m<sup>-1</sup> e o teste de emulsificação apresentou emulsões estáveis para n-alcenos, aromáticos, petróleo e óleos vegetais.

#### 2.5.1.3. Fatores físico-químicos

O controle e a otimização das condições operacionais como pH, temperatura, agitação, aeração e salinidade são fundamentais para o sucesso da ampliação de escala de produção de biossurfactantes, capazes de torná-los economicamente competitivos em relação aos surfactantes químicos.

O pH e a temperatura são parâmetros importantes na produção de biossurfactantes. Os micro-organismos podem crescer em uma faixa de pH que varia de 2,0 até 11,0. Independentemente do pH que o micro-organismo seja capaz de suportar, faz-se necessário conhecer o pH ótimo para o crescimento deste (BEZERRA, 2006). Camerini e Chanin et al. (2005) avaliaram o efeito da temperatura, pH e umidade do meio na produção de biossurfactantes pelo fungo *Phialomonium* sp. em meio sólido. Melhores resultados foram encontrados na temperatura de 35 °C, pH 5,0 e umidade de 60 %.

Bueno, Silva e Garcia-Cruz (2010) testaram diferentes pHs (5, 6, 7 e 8) para a produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e *B. subtilis*. Os autores observaram que para ambas as cepas a redução da tensão superficial e o índice de emulsificação foi maior em pHs 5,0 e 7,0. Resultado semelhante foi obtido por Ferrarezzo (1998), ao testar diferentes pHs (5, 7 e 11) para produção de biossurfactantes por *Bacillus* sp., obtendo o melhor índice de emulsificação em pH 7,0.

Alguns micro-organismos modificam o pH do meio de cultivo durante seu crescimento, tornando necessária a inclusão de soluções tampão a fim de garantir que o pH se mantenha dentro dos limites ótimos para crescimento e formação do produto esperado (BEZERRA, 2006). De acordo com Desai e Banat (1997), o pH apresenta importância na produção de ramnolipídios por *Pseudomonas*, sendo máxima em pH de 6,0 a 6,5 e diminuindo em pH acima de 7,0.

Drouin e Cooper (1992) mostram que a composição do biossurfactantes produzido por *A. paraffineus* foi afetada pela temperatura. *Bacillus* sp. apresentou crescimento e produziu biossurfactantes em temperatura acima de 40 °C. Bicca et al. (1999) estudaram diferentes temperaturas (30, 37 e 40 °C) na produção de biossurfactantes por *Rhodococcus* AC 239, obtendo-se melhores resultados a 37 °C. Nos estudos realizados por Acevedo e McInerney (1996) com a finalidade de determinar a capacidade de micro-organismos termofílicos de produzirem biossurfactante e/ou bioemulsificante, isolou-se bioemulsificante de *Methanobacterium thermoautotrophium*, o qual foi ativo a temperaturas acima de 80 °C. Os emulsificantes foram eficazes na formação de emulsões viscosas, mas não na redução da tensão superficial da água e a tensão interfacial entre água e hexadecano.

Micro-organismos psicrófilos têm uma temperatura ótima de crescimento de 15 °C ou menos, uma temperatura máxima de crescimento de aproximadamente 20 °C e uma temperatura mínima para o crescimento de 0 °C ou menos. Bactérias psicrófilas têm sido isoladas de diversos ambientes naturais. Pruthi e Cameotra (1997) estudaram a produção de biossurfactantes por *Arthrobacter* (uma cepa Antártica). O biossurfactante foi produzido

durante o crescimento do micro-organismo em uma fonte de carbono imiscível em água, n-hexadecano, e foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 68,0 para 30,6 mN m<sup>-1</sup> e mostrou ótima capacidade emulsificante.

Além da temperatura e pH do meio, a salinidade é outro parâmetro ambiental importante que influencia no processo de produção de biossurfactante e, conseqüentemente, na biodegradação de compostos de petróleo (MNIF et al., 2011). Abu-Ruwaida et al. (1991) verificaram que concentrações salinas afetaram a produção de biossurfactantes. Alguns biossurfactantes, no entanto, não foram afetados por concentrações salinas acima de 10 %, embora pequenas reduções nas CMCs fossem detectadas. Já Yakimov et al. (1995) citado por Cameotra e Makkar (1998), estudaram a produção de surfactantes lipopeptídios por *Bacillus licheniformis* e verificaram que esta cepa foi capaz de produzir biossurfactantes em concentrações salinas superiores a 13 %.

Certo grupo de micro-organismos pode crescer e continuar a viver sob uma ampla faixa de concentração salina. Bertrand et al. (1990) citado por Cameotra e Makkar (1998), estudaram o isolamento de bactéria hidrocarbonoclástica halófila, mostrando que a metabolização do hidrocarboneto pode ocorrer em condições hipersalinas.

*Geobacillus pallidus* C5, uma bactéria aeróbia, halotolerante e termofílica, foi isolada a partir de um campo de petróleo e após, cultivada com tirosol como única fonte de carbono. O melhor rendimento em biomassa ocorreu a 50°C e na presença de 3 % (m v<sup>-1</sup>) de NaCl. Ainda, essa cepa foi capaz de degradar compostos aromáticos e hidrocarbonetos (CHAMKHA et al., 2008). *Halomonas* sp. C2SS100, também isolada de um campo de petróleo, foi capaz de produzir biossurfactante e degradar hidrocarbonetos em concentração salina elevada (MNIF et al., 2009).

Ainda, o efeito da variação na quantidade disponível de oxigênio é notório no crescimento de micro-organismos aeróbios, para os quais é indispensável e facultativo para aqueles que podem crescer na ausência de oxigênio. Nos micro-organismos aeróbios, a concentração de oxigênio fornecida influencia o rendimento da cultura, enquanto para os facultativos, além da diferença no rendimento, há diferenças na velocidade do crescimento e nos produtos obtidos dos micro-organismo (SCHMIDELL, 2001).

Veenanadig et al. (2000) estudaram a produção de biossurfactante através de fermentação em estado sólido por *Bacillus subtilis* em biorreator de coluna contendo farelo de trigo como meio de cultivo, testando diferentes vazões de aeração, variando de 10 a

20 L min<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos mostraram que a vazão de ar de 20 L min<sup>-1</sup> proporcionou maior produção de biossurfactante.

A velocidade de agitação é outro parâmetro importante para otimização da produção de biossurfactante, quando produzidos por micro-organismos aeróbios e isto depende tanto do reator utilizado quanto do micro-organismo. O aumento na velocidade de agitação pode diminuir a produção de biossurfactante devido ao efeito de cisalhamento na parede celular, influenciando na cinética de crescimento do micro-organismo, ou pode aumentar a produção, junto com a aeração, devido ao aumento da taxa de transferência de oxigênio (SCHMIDELL, 2001).

Agitações mais velozes podem causar redução da concentração do biossurfactante devido ao efeito da tensão de cisalhamento. A transferência de oxigênio é um parâmetro chave na otimização e aumento de escala da produção do biossurfactante surfactina (DESAI; BANAT, 1997).

Em estudos realizados por Adamczak e Bednarski (2000), foi verificado que o rendimento de biossurfactantes produzidos por *Candida antarctica* na fermentação submersa dependem especialmente da fonte de carbono e condições de aeração no meio de cultivo. Testes utilizando taxas de aeração de 1 e 2 vvm foram realizados, e pôde ser observado que o maior rendimento na produção de biossurfactantes foi alcançado com aeração de 1 vvm.

## **2.5.2. Produção de biossurfactantes por bactérias**

### **2.5.2.1. *Bacillus***

Bactérias do grupo *Bacillus* são as principais produtoras de biossurfactantes lipopeptídicos (AL-WAHAIBI et al., 2014). Os lipopeptídios produzidos por *B. subtilis* são classificados em três famílias, de acordo com a sequência de aminoácidos que compõem a parte peptídica da molécula e o tipo e grau de ramificação do ácido graxo (ROMERO et al., 2007). A família iturina, representada por iturina A, micosubtilina e bacilomicina (TSUGE et al., 2005). A família das fengicinas, que incluem as plipastatinas A e B, compostos de grande espectro de ação antifúngica e antibiótica (VOLPON; BESSON; LANCELIN, 2000). Por fim, a família surfactina, que consiste na mais estudada família de lipopeptídios (MAGNET-DANA et al., 1992). Surfactina é um dos mais poderosos biossurfactantes, tendo a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m<sup>-1</sup>, adequada para aumentar a degradação de óleo (AL-WAHAIBI et al., 2014; LIU et al., 2015).

Isoformas de surfactina que apresentam diferenças no comprimento da cadeia carbônica do ácido  $\beta$ -hidroxigraxo, bem como na proporção entre estas isoformas, tem sido relatadas na literatura (WEI et al., 2003; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFa; HASSOUNA, 2008). Essas diferenças estruturais das isoformas e as proporções entre elas conferem a este lipopeptídio diversas propriedades (ARIMA et al., 1968). COOPER e GOLDENBERG (1987) analisaram a produção de biossurfactante por duas espécies de bactérias do gênero *Bacillus*. A bactéria *Bacillus cereus* foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para  $28 \text{ mN m}^{-1}$  e apresentar índice emulsificante em torno de 60 %, tanto no meio na presença quanto na ausência das células do micro-organismo, o que indicou produção extracelular de biossurfactante. Já a bactéria *Bacillus* sp. IAF 343 não ocasionou apreciável redução da tensão superficial, porém o índice emulsificante ficou em torno de 60 %, tanto no meio na presença quanto na ausência das células da bactéria.

Estudos para a otimização da produção de surfactina tem sido realizados em frascos agitados, bem como em biorreatores, operado em sistemas contínuos ou em batelada alimentada (MULLIGAN; GIBBS, 1990). O estudo da influência das condições nutricionais foi realizado, com a finalidade de obter condições ótimas de produção de surfactina, já que estudos iniciais utilizando caldo nutritivo (peptona  $5 \text{ g L}^{-1}$  e extrato de carne  $3 \text{ g L}^{-1}$ ) apresentaram baixa produtividade, cerca de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de surfactina (ARIMA et al., 1968).

*Bacillus subtilis* é uma rizobactéria gram-positiva, esporulante, produtora de diversos metabólitos secundários, cuja variabilidade de estruturas e atividades biológicas tem atraído o interesse de pesquisadores de diversas áreas (STEIN, 2005).

Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008) conduziram estudos de otimização da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* BS5 a partir da avaliação do efeito de diferentes nutrientes e sua concentração e das condições ambientais em cultivos realizados em frascos agitados. Dentre as fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas testadas, o  $\text{NaNO}_3$  à concentração de  $5 \text{ g L}^{-1}$  constituiu a melhor fonte de nitrogênio para a linhagem testada. A adição de aminoácidos que constituem a porção peptídica da molécula de surfactina à concentração de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  em substituição ao  $\text{NaNO}_3$  não promoveram aumento da produtividade do biossurfactante. A fonte de carbono que promoveu maior rendimento, foi melaço ( $160 \text{ mL L}^{-1}$ ) e os micronutrientes foram  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,16 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,27 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $0,017 \text{ g L}^{-1}$ ) atingindo concentração equivalente a  $1,12 \text{ g L}^{-1}$  de surfactina bruta (obtida através de precipitação ácida).

A utilização de óleo de palma como fonte de carbono, para a produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* PT2 isolado de lodo de óleo e solos contaminados

com petróleo foi realizado por Pornsunthorntaweewa et al. (2008). O biossurfactante obtido após 51 h de cultivo foi capaz de reduzir a tensão superficial da água pura para  $26,4 \text{ mN m}^{-1}$ , com a concentração micelar crítica (CMC) de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Ainda, o biossurfactante produzido, foi capaz de degradar o óleo de forma mais eficaz do que três surfactantes sintéticos: Tween 80, dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBS) e Alfoterra 145-5PO.

Al-Wahaibi et al. (2014) estudaram a produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* B30 utilizando glicose, sacarose, amido e melão como fontes de carbono e avaliaram a estabilidade do biotensioativo sob diferentes condições de temperatura, pH e salinidade, além do seu efeito na degradação avançada de petróleo. O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial e interfacial para  $25,6 \text{ mN m}^{-1}$  e  $3,6 \text{ mN m}^{-1}$ , respectivamente, em menos de 12 h utilizando glicose ou melão.

#### 2.5.2.2. *Corynebacterium*

Crosman, Pinchuk e Cooper (2002) estudaram o aumento da produção de biossurfactantes por *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 utilizando hexadecano como substrato. O biossurfactantes do tipo fosfolipídio produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial para valores abaixo de  $32 \text{ mN m}^{-1}$ .

Thavasi et al. (2007) produziram e caracterizaram biossurfactantes a partir de fontes renováveis. Os substratos utilizados foram resíduos de óleo de motor e bolo de óleo de amendoim. A máxima concentração de biomassa ( $9,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de biossurfactante ( $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi obtida com bolo de óleo de amendoim após 120 e 132 h, respectivamente. O bioemulsificante foi caracterizado como glicolipopeptídeo composto de carboidratos (40%), lipídios (27 %) e proteínas (29 %). O biossurfactante foi capaz de emulsionar o resíduo de óleo de motor, petróleo bruto, óleo de amendoim, querosene, xileno, naftaleno e antraceno, sendo essas atividades de emulsificação superiores a atividade encontrada com Triton X-100.

Pinto (2008) avaliou o cultivo sólido de *Corynebacterium aquaticum* e *Aspergillus fumigatus* em biorreator de coluna e em Erlenmeyer, e verificou que a bactéria *C. aquaticum* mostrou-se mais eficiente na redução das tensões superficiais ( $31,3 \text{ mN m}^{-1}$ ) e interfaciais ( $6,2 \text{ mN m}^{-1}$ ) do que o fungo *A. fumigatus*. Por outro lado, o fungo apresentou melhores resultados com relação à atividade emulsificante.

A seleção de bactérias para a produção de biossurfactantes foi realizada por Pinto, Martins e Costa (2009). Foram utilizadas 4 culturas de bactérias: cultura pura de *Corynebacterium aquaticum*, cultura mista contendo *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus*

sp., cultura mista contendo *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides*; isoladas de efluentes provenientes da lavagem de caminhões transportadores de combustíveis e cultura pura de *Bacillus subtilis*. Destes, a cultura pura de *Corynebacterium aquaticum* mostrou maior eficiência quanto à capacidade para promover a formação de emulsões e ainda a menor tensão superficial (28,8 mN m<sup>-1</sup>).

### 2.5.3. Produção de biossurfactantes por microalgas

As microalgas se evidenciam por apresentar inúmeras potencialidades, como fonte de alimentos e fonte de compostos bioativos, como os biossurfactantes. O cultivo de microalgas para a produção de biossurfactantes surge como alternativa para reduzir a utilização de surfactantes sintéticos, por apresentarem baixa toxicidade, serem biodegradáveis e poderem ser sintetizados através do emprego de recursos renováveis (CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2014; RADMANN et al., 2015).

Outra vantagem de cultivar microalgas para produção de biossurfactantes é que muitas são GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Organismos com certificado GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BARTH; GAILLARD, 1997; CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2014; RADMANN et al., 2015).

Há poucos relatos na literatura a respeito da produção de biossurfactantes por microalgas, mas vários autores demonstram a produção de compostos como glicolipídios, fosfolipídios, lipídios neutros, por microalgas (BIGOGNO et al., 2002; BOROWITZKA, 1988; CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2014; CEVC, 1993; CHAUTON et al., 2004; KOSARIC, 1992; RADMANN et al., 2015; RODOLFI et al., 2009; SZUHAJ, 1989; XUE et al., 2002), que podem ser classificados como biossurfactantes. Porém, ainda não foi demonstrado o uso destes em processos de biorremediação. Segundo Borowitzka (1988), dentre as microalgas, as maiores produtoras de glicolipídios e fosfolipídios são as cianobactérias e as clorofíceas, respectivamente.

De acordo com Xue et al. (2002), os glicolipídios são os componentes lipídicos em maior concentração nas membranas das cianobactérias. Estes mesmos autores estudaram a composição de glicolipídios da microalga *Spirulina platensis*, e os resultados mostraram 28,2% de glicolipídios do total lipídico.

Mendes, Reis e Palavra (2006) estudando a extração do ácido  $\gamma$ -linolênico de *Spirulina*, obtiveram rendimentos diferentes para lipídios neutros, glicolipídios e

fosfolipídios, dependendo do solvente que foi utilizado. Os resultados demonstraram, em relação à concentração de lipídios, até 27,5 % de fosfolipídios e 52 % de glicolipídios quando foi utilizado clorofórmio, metanol e água.

Shepherd et al. (1995) avaliaram diferentes micro-organismos para produção extracelular de emulsificantes de alta massa molar para uso potencial em alimentos. Foram testados 24 produtos extracelulares de bactérias, leveduras e microalgas. Dentre as microalgas testadas estavam *Porphyridium cruentum* e *Spirulina* spp., cultivadas em fotobiorreatores com meio contendo sais inorgânicos e fonte orgânica de carbono como glicose, sacarose, lactose e óleo vegetal. *P. cruentum* e *Spirulina* spp. apresentaram 0,71 e 0,70 unidades de densidade óptica de atividade emulsificante e 100 e 47% de estabilidade emulsionante, respectivamente.

Radmann (2011) selecionou e estimulou microalgas quanto à produção de biossurfactantes, através de cultivo mixotrófico. As microalgas *S. nidulans* LEB-25 e *Spirulina* sp. LEB-18 apresentaram redução da tensão superficial dos meios de 70 para 43 mN m<sup>-1</sup>, indicando a produção de biossurfactantes pelas microalgas estudadas utilizando glicose como fonte de carbono. Carvalho, Oliveira e Costa (2014) estudaram a influência do fósforo e do nitrogênio para a produção de biossurfactantes por *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina platensis paracas* e *Spirulina* sp. LEB 18. Os resultados mostraram que *Spirulina* sp. LEB 18 foi mais favorável para a produção de biossurfactante em relação às outras cepas, apresentando redução da tensão superficial de 31,2 mN m<sup>-1</sup>, quando foi utilizada maior concentração de nitrogênio (412 mg L<sup>-1</sup>) e sem a adição de fósforo.

A produção de biossurfactantes por microalgas em cultivo autotrófico e mixotrófico foi investigada por Radmann et al. (2015). As microalgas estudadas foram: *Arthrospira* sp. LEB 18, *Synechococcus nidulans* LEB 25, *Chlorella minutíssima* LEB 108, *Chlorella vulgaris* LEB 106 e *Chlorella homosphaera*. Foi observada a redução da tensão superficial para todas as microalgas estudadas, sendo a maior redução obtida no cultivo mixotrófico de *Arthrospira* sp. LEB 18, que atingiu 43 mN m<sup>-1</sup>.

Raymundo et al. (2005) obtiveram resultados significativos (p<0,05) quando utilizaram *Chlorella vulgaris* como estabilizante de emulsões óleo/água. Segundo Gouveia et al. (2004) a utilização de biomassa de microalgas como ingrediente de emulsões em alimentos, tem sido recentemente estudada na atuação como agente de coloração. A adição de biomassa de microalgas em emulsão pode produzir diferentes efeitos: melhoria da estabilidade através do desenvolvimento de efeitos com o conteúdo protéico ou perda de viscoelasticidade na superfície quando induzido ao deslocamento da proteína na interface, como qualquer outro aditivo emulsionante. Entre os estudos que abordam a produção de

biossurfactantes a partir de microalgas, não existem relatos na literatura quanto a utilização desses para biorremediação de solos contaminados.



## **CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**



## DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para apresentação e compreensão dos resultados obtidos, o trabalho foi dividido em dois artigos:

**Artigo 1:** Produção de biossurfactantes por bactérias e sua utilização na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP);

**Artigo 2:** Biossurfactantes de microalgas na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos



## ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR BACTÉRIAS E SUA UTILIZAÇÃO NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

### RESUMO

Biorremediação é um processo em que micro-organismos são empregados para decomposição parcial ou total de poluentes do meio ambiente, dentre estes, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) têm recebido grande atenção, devido à sua toxicidade. Os biossurfactantes são compostos tenso ativos de baixa toxicidade e biodegradáveis que possuem potencial na degradação de produtos poluentes principalmente nos derivados de petróleo. Neste contexto, o presente trabalho visou produzir biossurfactantes a partir das bactérias *Bacillus subtilis* CCT 7678 e *Corynebacterium aquaticum* e utilizá-los na biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível. O cultivo aeróbio submerso da bactéria *Bacillus subtilis* CCT 7678 foi realizado em fermentadores tipo Erlenmeyer de 1000 mL e o cultivo em estado sólido, de *Corynebacterium aquaticum* foi realizado em biorreatores de coluna de leito fixo com dimensões internas 50 x 250 mm (diâmetro e altura). Tanto no solo contaminado com petróleo, como no solo contaminado com óleo combustível, as maiores taxas de degradação de HAP (97,3 e 93,5 %, respectivamente) foram obtidas com os biossurfactantes da bactéria *Corynebacterium aquaticum* que se caracterizou por uma redução da tensão superficial (72 mN m<sup>-1</sup> para 30,4 mN m<sup>-1</sup>) e de atividade emulsificante 99,7 %.

**Palavras-chave:** *Bacillus subtilis*. Biossurfactante. *Corynebacterium aquaticum*. Emulsificante. HAP.

### ABSTRACT

Bioremediation is a process in which microorganisms are used for partial or total decomposition of environmental pollutants, among which polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) have received great attention due to their toxicity. The biosurfactants are surface-active compounds of low toxicity and biodegradable that have potential in the degradation of polluting products mainly petroleum derivative products. In this context, the present work aimed to produce biosurfactants from the bacteria *Bacillus subtilis* CCT 7678 and *Corynebacterium aquaticum* and to use them in the bioremediation of soils contaminated with petroleum and fuel oil. The submerged aerobic cultivation of *Bacillus subtilis* CCT 7678 was carried out in fermenters of erlenmeyer type of 1000 mL and the solid state aerobic cultivation of *Corynebacterium aquaticum* was carried out in fixed bed column bioreactors with internal dimensions 50 x 250 mm (diameter and height). Both to the petroleum-contaminated soil and fuel oil-contaminated soil, the highest rates of PAH degradation (97.3 and 93.5 %, respectively) were obtained with the biosurfactants of the bacterium *Corynebacterium aquaticum*, which was characterized by a reduction of surface tension (from 72 mN m<sup>-1</sup> to 30.4 mN m<sup>-1</sup>) and 99,7 % emulsifying activity.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*. Biosurfactant. *Corynebacterium aquaticum*. Emulsifier. PHA.

## 1 INTRODUÇÃO

A industrialização mundial está voltada e baseada na capacidade energética do petróleo e seus derivados. Com isto cresce a possibilidade de contaminação por derrames inusitados, geralmente atingindo grandes áreas terrestres, marítimas, lacustres e outras. O uso de novas tecnologias que visam minimizar os efeitos destes contaminantes vem sendo estudados por vários seguimentos, sendo um destes a biorremediação, que permite utilizar micro-organismos para a degradação destes compostos, em sua maioria altamente prejudiciais a saúde humana (DAS; CHANDRAN, 2010).

A biodegradação de compostos ricos em hidrocarbonetos é dependente de sua estrutura química e do tamanho de sua cadeia carbonada, quanto menor a cadeia mais solúvel e rápida será sua degradabilidade. Os biossurfactantes interagem com os hidrocarbonetos e assim, tornando-os mais solúveis em água, o que aumenta a disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos e conseqüentemente sua metabolização (CHOSSON et al., 1991).

Biossurfactantes são compostos produzidos por várias espécies de micro-organismos que se caracterizam por sua atividade tensoativa. Esses compostos compreendem uma diversidade de moléculas quimicamente diferentes como glicolipídios, lipossacarídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídios (BOGNOLO, 1999; DESAI; DESAI, 1993; LANG, 2002; MAIER, 2003) e alguns polímeros (DESAI; DESAI, 1993; MAIER, 2003).

A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, o aumento da preocupação ambiental combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes biológicos em decorrência de serem biodegradáveis, diminuindo, assim, o impacto ambiental (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008). Entre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente os produzidos por *Bacillus subtilis* (AL-WAHAIBI et al., 2014). Além do gênero *Bacillus*, a bactéria *Corynebacterium alkanolyticum* estudada por Crosman, Pinchuk e Cooper (2002) produziu biossurfactantes do tipo fosfolipídio, capaz de reduzir a tensão superficial para  $32 \text{ mN m}^{-1}$ . Bognolo (1999) relata que biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em áreas contaminadas.

Desta maneira, o presente trabalho propôs cultivar bactérias *Bacillus subtilis* CCT 7678 e *Corynebacterium aquaticum*, produtoras de biossurfactante para biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

#### 2.1.1 Crescimento e manutenção dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *Bacillus subtilis* CCT 7678 e *Corynebacterium aquaticum*. A linhagem de *Bacillus subtilis* CCT 7678 foi doada pela Fundação André Tosello situada em Campinas – SP, Brasil. A bactéria *Corynebacterium aquaticum* foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP).

As culturas de bactérias foram mantidas sob refrigeração, em tubos de ensaio e em Erlenmeyers contendo ágar nutriente, que foi formulado conforme a seguir ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de carne (1,0); extrato de levedura (2,0); peptona (5,0); NaCl (5,0) e ágar-ágar (15,0) (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998).

**Figura 1** - Inóculos de crescimento de *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus subtilis* CCT 7678.



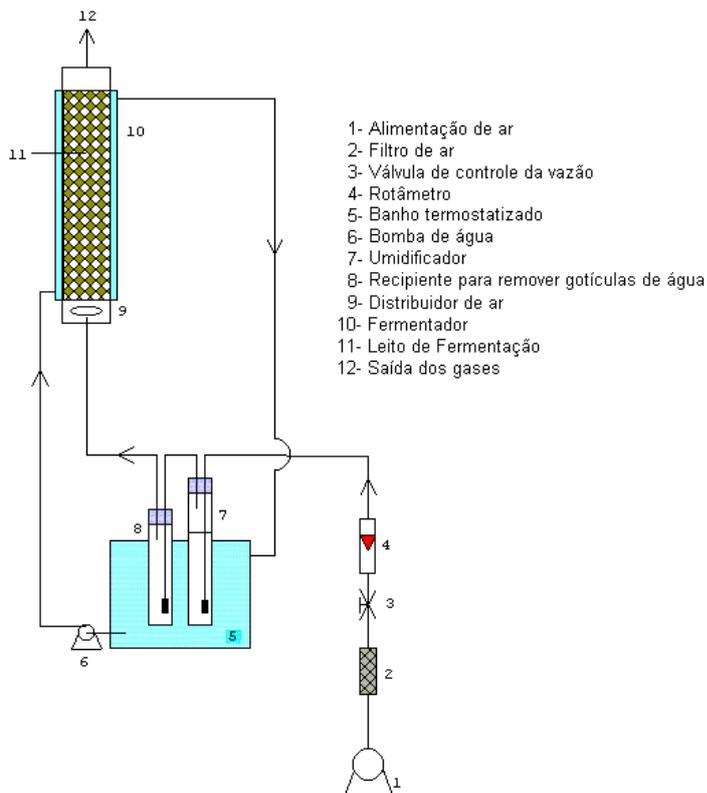
A propagação dos inóculos foi realizada em frascos Erlenmeyers contendo ágar nutriente (Figura 1), formulado conforme a seguir ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de carne (1,0); extrato de levedura (2,0); peptona (5,0); NaCl (5,0). As culturas foram incubadas por 48 h a 30 °C. Após, foi realizada a raspagem da superfície do ágar com meio nutriente e ao atingir a

densidade ótica 0,8-0,9 em comprimento de onda de 600 nm, as suspensões foram utilizadas como inóculos, sendo adicionadas ao meio de cultura na concentração de 2 % (v v<sup>-1</sup>) (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

### 2.1.2 Fermentação em estado sólido

O cultivo da bactéria *Corynebacterium aquaticum* foi realizado em estado sólido em biorreatores de coluna de leito fixo (Figura 2), com dimensões internas 50 x 250 mm (diâmetro e altura) durante 144 h. O ar comprimido utilizado passou primeiramente por filtros preenchidos com lã de vidro e posteriormente a sua vazão foi controlada por rotômetros previamente calibrados (Cole-Parmer Instrument Company, USA). A corrente de ar foi umidificada, e em seguida, realizada a remoção das gotas, sendo posteriormente injetado nas colunas. A temperatura de incubação do meio foi mantida constante em 30 °C pela circulação de água (proveniente de banho termostatzado) através do encamisamento do biorreator. O material utilizado foi esterilizado a 121 °C por 15 min. A umidade foi fixada em 65 % (MARTINS et al., 2007a).

**Figura 2** - Esquema do cultivo em estado sólido em biorreator de coluna.



Fonte: COSTA (1996)

O meio de cultivo foi composto de casca de arroz e farelo de trigo (utilizados como fonte de carbono) nas proporções 15 e 85 %, respectivamente, com adição de solução nutriente composta por:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (50,0 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3,0 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,0 mM),  $\text{CaCl}_2$  (7,0  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,8 mM), EDTA sódico (4,0  $\mu\text{M}$ ), e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,0 mM) (YEH; WEI; CHANG, 2005). O farelo de trigo utilizado foi retido em peneiras Tyler 35 e 32, de abertura entre 0,42 e 0,50 mm, respectivamente (MARTINS et al., 2007a).

O farelo de trigo utilizado como fonte de carbono foi cedido pela empresa Moinho do Sul S/A situado em Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A casca de arroz foi cedida pelo engenho Casa do Arroz, Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, Brasil.

### 2.1.3 Fermentação submersa

O cultivo submerso da bactéria *Bacillus subtilis* CCT 7678 foi realizado em fermentadores tipo Erlenmeyer de 1000 mL com volume útil de 500 mL, a 30 °C, agitação orbital (Incubadora Modelo Certomatr BS-1 B - Braum Biotech International, Alemanha) a 200 rpm por 72 h (Figura 3). O meio mineral foi formulado como descrito por Yeh, Wei e Chang (2005), constituído de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (50,0 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3,0 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3,0 mM),  $\text{CaCl}_2$  (7,0  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,8 mM), EDTA sódico (4,0  $\mu\text{M}$ ), e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,0 mM). A fonte de carbono utilizada foi glicose 4 % e o pH inicial do meio foi 7,0. Após, o meio de cultivo foi esterilizado a 121 °C por 15 min.

**Figura 3** - Fermentação submersa de *Bacillus subtilis* CCT 7678



#### **2.1.4 Extração dos biossurfactantes**

A extração dos surfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* foi realizada com água a 90 °C na proporção 1:9 (farelo fermentado:solvente) (MARTINS et al., 2007b). Após a adição do solvente, a amostra foi submetida à agitação (Incubadora Modelo Certomatr BS-1 B - Braum Biotech, Alemanha) a 160 rpm e 50 °C por 30 min, em seguida foi filtrada à vácuo para a retirada de excesso de sólidos presentes. O filtrado foi centrifugado (Centrifuga modelo CR 22GIII – Hitachi, Japão) a 9200 x g por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para o processo de biorremediação (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Quando a biomassa foi gerada pela bactéria *Bacillus subtilis* CCT 7678, a extração dos surfactantes foi realizada após 72 h de fermentação submersa. O meio foi filtrado em papel de filtro quantitativo (JP) seguido de esterilização a 121 °C por 15 min.

## **2.2 AVALIAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES**

### **2.2.1 Determinação da tensão superficial**

A tensão superficial do extrato foi determinada em tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha), usando o método do anel Du Nouy, conforme Figura 4. Este tensiômetro determina tensões superficiais e interfaciais com a ajuda de um anel suspenso e fixado em uma balança de precisão. A amostra, sempre líquida, foi colocada em recipiente específico do equipamento, o anel foi mergulhado no líquido e zerado. O anel foi então abaixado, de forma que o filme líquido produzido abaixo do anel foi alongado. Quando o filme líquido foi estendido, a força máxima foi determinada e medida, obtendo-se a tensão superficial. A tensão superficial foi determinada com a amostra em contato com o ar (COSTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006).

**Figura 4** - Medição da tensão superficial em tensiômetro.

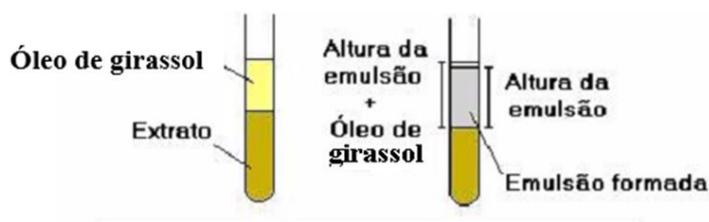


### 2.2.2 Atividade emulsificante

A atividade emulsificante água em óleo ( $AE_{o/w}$ ) do extrato foi determinada de acordo com o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). O extrato contendo os biossurfactantes foi homogeneizado com óleo de girassol com auxílio de agitador de tubos (modelo AP 56 –Phenix, Brasil) e mantido em repouso por 24 h. A atividade emulsificante foi calculada pela Equação 1. O esquema do teste de atividade emulsificante está apresentado na Figura 5.

$$AE (\%) = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}} \quad (1)$$

**Figura 5** - Teste de atividade emulsificante



FONTE: Adaptado de Martins (2005).

### 2.3 TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados de tensão superficial e atividade emulsificante foram avaliados por meio da diferença de médias (teste de Tukey) ao nível de significância de 5%, em relação aos diferentes biossurfactantes produzidos.

## 2.4 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS

### 2.4.1 Coleta da amostra de solo

A coleta do solo arenoso foi realizada na localidade do Arraial, Rio Grande (RS) com as seguintes localizações, latitude 29°50'043"S e longitude 50°31'216"W. Peneiras de 4,00 a 0,062 mm foram utilizadas e a massa retida em cada uma das peneiras foi comparada à Escala de Wentworth para classificação do solo (Tabela 1) (SUGUIO, 1973).

**Tabela 1** - Classificação granulométrica de solo arenoso

<b>Tyler</b>	<b>Abertura (mm)</b>	<b>Classificação</b>
-5+9	4,00 a 2,00	Grão
-9+16	1,68 a 1,00	Areia muito grossa
-16+32	0,84 a 0,50	Areia grossa
-32+60	0,42 a 0,250	Areia média
-60+115	0,21 a 0,125	Areia fina
-115+250	0,105 a 0,062	Areia muito fina

Fonte: SUGUIO (1973)

### 2.4.2 Determinação de fungos e bactérias totais no solo

Em condições assépticas, foi pesado 25 g de solo e homogeneizado em blender, com 225 mL de água peptonada 0,1 %. A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), foram preparadas diluições seriadas até  $10^{-5}$ . Para enumeração de fungos foi inoculado, em triplicata, 0,1 mL de amostra em ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC), seguido de incubação a 25 °C por 5 d. Para a determinação de bactérias totais, em triplicata, foi inoculado 0,1 mL de amostra em ágar Padrão para Contagem (PCA), seguido de incubação a 35 °C por 48 h. Todos os materiais e meios utilizados foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min (NEUSELY et al., 2010).

## 2.5 PREPARAÇÃO DO ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO

### 2.5.1 Homogeneização

Em frasco com capacidade de 3000 g foi adicionado 1868,75 g de solo arenoso não estéril e 625 g de solo arenoso seco à 105 °C (AOAC, 2000). A umidade do solo para o processo de biorremediação foi determinada de acordo com AOAC (2000) e corrigida a 11 %, semanalmente, com água destilada estéril. O solo foi contaminado com 0,25 % (m m<sup>-1</sup>) do poluente (óleo combustível ou petróleo), de acordo com EPA (2001). Após a contaminação do solo, as amostras foram submetidas à homogeneização (Agitador rotatório TE – 33I EI - Tecnal, Brasil) (Figura 6) durante 2 h a 30 rpm. Os biossurfactantes foram adicionados de acordo com a atividade emulsificante previamente determinada. O volume de biossurfactante utilizado em cada ensaio foram determinados de acordo com as Equações (2) e (3) (Tabela 2).

**Figura 6** - Homogeneização das amostras para biorremediação



$$m_{\text{óleo de girassol emulsificado}} = m_{\text{óleo de girassol total}} \times AE \quad (2)$$

$$VB_{\text{biorremediação}} = \frac{m_{\text{contaminante}} \times VB_{\text{atividade emulsificante}}}{m_{\text{óleo de girassol emulsificado}}} \quad (3)$$

Em que: m = massa (g); AE = atividade emulsificante (%); VB<sub>biorremediação</sub> = volume de biossurfactante utilizado na biorremediação do contaminante (mL); VB<sub>atividade emulsificante</sub> = volume de biossurfactante utilizado na determinação da atividade emulsificante (mL).

**Tabela 2** - Delineamento experimental da biorremediação

Reatores	Micro-organismos	Óleo (%)	Petróleo (%)	Biossurfactante (ml)
Reator 1	<i>B. subtilis</i> CCT 7678	0,25	-	5,30
Reator 2	<i>B. subtilis</i> CCT 7678	-	0,25	5,30
Reator 3	<i>C. aquaticum</i>	0,25	-	4,92
Reator 4	<i>C. aquaticum</i>	-	0,25	4,92

### 2.5.2 Biorremediação

No processo de biorremediação foram utilizados 5 biorreatores de vidro, sendo 1 sem uso de contaminante para determinação de umidade, com dimensões de 250 mm x 250 mm x 250 mm (Figura 7). Em cada biorreator foram adicionados 2500 g de amostra proveniente da homogeneização, conforme o item 2.5.1. Os ensaios foram realizados na parte externa do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG (latitude 32°04'21.2"S e longitude 52°10'04.6"W), em ambiente aberto expostos às condições ambientais naturais, tanto de temperatura quanto de umidade e suas variações. A biorremediação ocorreu durante 90 dias. A amostragem foi realizada nos dias 0, 3, 6, 15, 30, 45, 60 e 90 para a análise dos hidrocarbonetos. Os pontos coletados foram selecionados aleatoriamente. As amostras foram congeladas a -80 °C (New Brunswick Scientific, Modelo U 535-86, Inglaterra) e desidratadas por liofilização (Liofilizador Modelo 64132 – Labconco, USA), seguido de armazenamento a -18 °C e posteriormente analisadas quanto à concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

**Figura 7** - Biorreator de vidro utilizado no processo de biorremediação

## 2.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS PARA A BIORREMEDIAÇÃO

### 2.6.1 Determinação de pH e temperatura

Em cada coleta foi registrada a temperatura ambiente e do solo. A determinação do pH no solo foi realizada por eletrodo combinado de vidro tipo baioneta com leitura expressa em escala  $\pm 0,01$  e o pH do solo foi monitorado com a utilização de pHmetro digital portátil (Modelo Mettler AG 8603 – Toledo, Alemanha). A temperatura do solo foi medida com termômetro de mercúrio, com escala 0,1. A temperatura ambiente foi determinada com termômetro de mercúrio com máximo e mínimo (Icoterm).

### 2.6.2 Determinação de hidrocarbonetos

As amostras para a determinação dos hidrocarbonetos foram liofilizadas (Liofilizador Modelo 64132 – Labconco, USA) e moídas em gral. Após, foram acondicionadas em papel alumínio previamente calcinado em mufla a 450 °C. A seguir, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Compostos Orgânicos e Metais da FURG, onde foram realizadas as determinações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) em cromatógrafo gasoso (GC–EI–MS QP2010 Plus, Shimadzu, Japão), com coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m (Restek, Bellefonte, USA), acoplado a um detector espectrométrico de massas com filtro quadrupolar, segundo método descrito por Escarrone et al., (2014). Os HAP determinados foram: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)-antraceno e criseno.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A Tabela 3 apresenta os dados de tensão superficial e atividade emulsificante para os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus subtilis* CCT 7678. De acordo com Batista et al. (2006) os critérios para a seleção de biossurfactantes inclui a redução da tensão superficial abaixo de 40 mN m<sup>-1</sup> e a habilidade em manter pelo menos 50 % do volume da emulsão original, 24 h depois da sua formação. A partir dos resultados obtidos

foi possível verificar que tanto *Corynebacterium aquaticum*, quanto *Bacillus subtilis* CCT 7678, apresentaram biossurfactantes que atendem aos critérios de qualidade, em relação a redução da tensão superficial ( $< 40 \text{ mN m}^{-1}$ ) e atividade emulsificante ( $> 50 \%$  do volume da emulsão original, após 24 h) (BATISTA et al., 2006).

**Tabela 3** - Tensão superficial e atividade emulsificante dos biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus subtilis* CCT 7678

Micro-organismo	Tensão superficial* ( $\text{mN m}^{-1}$ )	Atividade emulsificante (%)
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	$30,4 \pm 0,2^b$	$99,7 \pm 0,1^a$
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678	$33,7 \pm 0,1^a$	$92,9 \pm 0,3^b$

\*Média  $\pm$  Desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A surfactina produzida por *Bacillus* spp. é conhecida como um dos mais efetivos biossurfactantes, porém, observa-se que os melhores resultados de tensão superficial ( $30,4 \text{ mN m}^{-1}$ ) e atividade emulsificante ( $99,7 \%$ ) foram obtidos no presente trabalho com biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum*. Crosman, Pinchuk e Cooper (2002) utilizaram *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 para a produção de biossurfactante e este, caracterizado como fosfolipídio, foi capaz de reduzir a tensão superficial para  $32 \text{ mN m}^{-1}$ . Já Pinto (2008) relata que os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum* reduziram a tensão superficial para  $31,3 \text{ mN m}^{-1}$  utilizando glicose como fonte de carbono.

### 3.2 BIORREMEDIAÇÃO

A aplicação dos biossurfactantes foi realizada no período de novembro/2015 a fevereiro/2016. Com o peneiramento do solo, foi verificado que  $70,6 \%$  em massa foi retido em peneira de  $0,250 \text{ mm}$ , sendo este solo classificado como areia média (Tabela 1).

O solo contém uma série de micro-organismos capazes de metabolizar compostos de petróleo. Na Tabela 4, observa-se a concentração de fungos e bactérias presentes no solo utilizado para o processo de biorremediação.

**Tabela 4** - Contagem de micro-organismos nativos presentes no solo

Micro-organismo	Contagem (UFC g <sup>-1</sup> )
Fungos totais	3,9 x 10 <sup>4</sup>
Bactérias totais	7,3 x 10 <sup>5</sup>

UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Alguns autores sugerem que a estratégia utilizada por micro-organismos anaeróbios para quebrar anéis aromáticos é a hidrogenação reductiva do anel, na qual primeiramente, o composto aromático é transformado em um intermediário central (como benzoil-CoA), em seguida o anel é reduzido e finalmente clivado por hidrólise (BERRY et al., 1987; EVANS, 1977; HEIDER; FUCHS, 1997).

Na via de degradação aeróbia, o oxigênio molecular é essencial para catalisar a hidroxilação inicial de HAP por micro-organismos aeróbios. O principal mecanismo para o ataque oxidativo inicial sobre HAP se dá através da incorporação de ambos os átomos de uma molécula de oxigênio, feita pelas dioxigenases, resultando na formação de *cis*-dihidrodiols. A dioxigenase que catalisa essas reações iniciais é formada por um sistema enzimático complexo que consiste de uma flavoproteína, uma ferredoxina, e uma proteína ferro-enxofre. O segundo passo na oxidação bacteriana de HAP é a re-aromatização do *cis*-dihidrodiol através de uma desidrogenase para formar um intermediário dihidroxilado (catecol). A dihidroxilação do núcleo benzênico é um pré-requisito para a clivagem do anel aromático. A fissão enzimática do anel aromático é também catalisada pela dioxigenase. Para que a clivagem ocorra, ambos os grupos hidroxila devem ser colocados seja na posição *orto* ou na posição *meta*. Na última fase do catabolismo dos HAP, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central (como acetil-CoA, succinato e piruvato) (CERNIGLIA, 1984).

A variação de pH e temperatura durante o processo de biorremediação está apresentada na Tabela 5. O pH foi semelhante em todos os ensaios, mantendo-se ligeiramente ácido, com variação de 5,7 a 4,9.

De acordo com Zilio et al. (2016) o biossurfactante aumenta a superfície de contato do contaminante e conseqüentemente, facilita a ação dos micro-organismos. Ainda, Aislabe et al. (2006) relatam que os ácidos orgânicos (-COOH) podem se acumular durante a biodegradação, formando *cis*, *cis*-ácido mucônico e semialdeído 2-hidroximucônico, sendo que a redução do valor do pH pode indicar elevada atividade microbiana no solo tratado.

A temperatura afeta a biodegradação de hidrocarbonetos pelo seu efeito sobre a natureza física e composição química do petróleo e derivados e sobre a taxa metabólica e composição da comunidade microbiana (LEAHY; COLWELL, 1990). Segundo Atlas (1981), a temperatura possui um efeito significativo sobre as taxas de degradação de hidrocarbonetos, devido à sua influência sobre fatores físicos como a viscosidade do óleo. Também, a viscosidade é menor em temperaturas mais altas, aumentando assim a possibilidade de emulsificação, bem como a área superficial disponível para atividade microbiana e solubilização dos compostos derivados do petróleo. Na Tabela 5, observa-se que a temperatura do solo permaneceu em torno de 23 °C e a ambiente variou de 20 a 26 °C. A diminuição da temperatura reduz a atividade microbiana, principalmente pelo enfraquecimento das ligações entre as proteínas, o que compromete a fluidez da membrana celular e, por conseguinte, a entrada de nutrientes e saída dos produtos do metabolismo. Por outro lado, o aumento da temperatura provoca a desnaturação das proteínas celulares (enzimas) inviabilizando as reações metabólicas (MADIGAN et al., 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

**Tabela 5** - Valores máximos e mínimos de pH e temperatura durante os processos de biorremediação

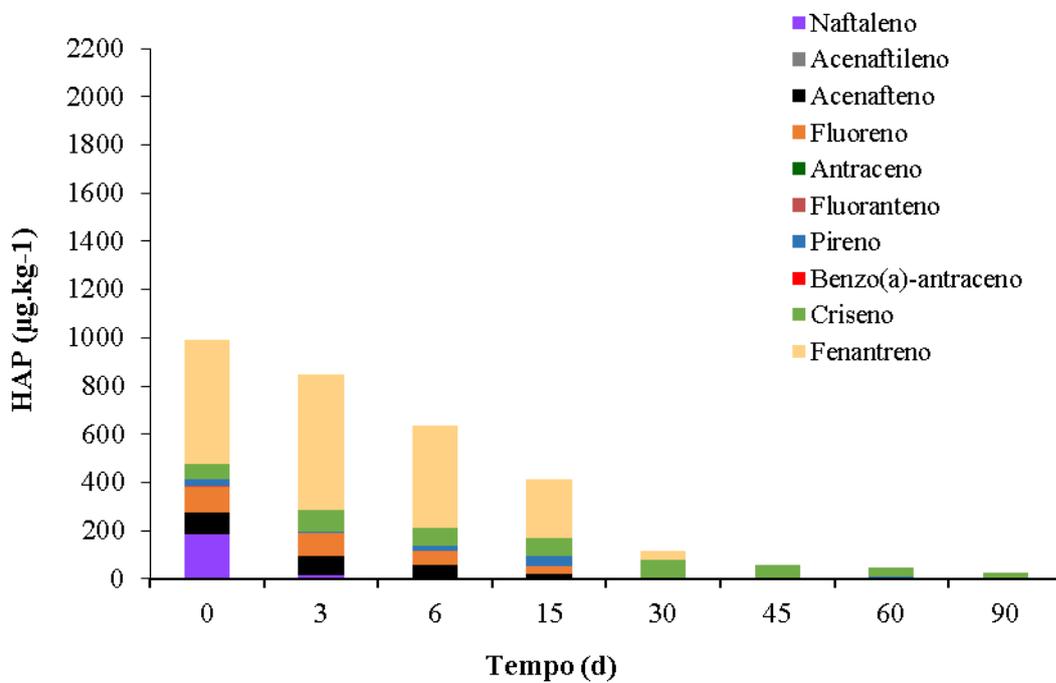
Ensaio	pH		Temperatura (°C)		
	Óleo combustível	Petróleo	Ambiente		Solo
			Mínima	Máxima	
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	5,4 ± 0,2	5,3 ± 0,2	20 ± 3	26 ± 4	23 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678	5,2 ± 0,2	5,3 ± 0,2			

A biodegradação somado ao uso dos biossurfactantes das duas bactérias agiram de forma semelhante na biorremediação de solo contaminado com petróleo, como pode ser observado nas Figuras 8 (a) e (b), sendo que o naftaleno, acenafteno e o fluoreno, foram os compostos mais rapidamente biodegradados, em até 15 d de biorremediação. O criseno foi o único HAP que se manteve durante os 90 d de biorremediação, variando de 56 a 45 µg kg<sup>-1</sup> com *Bacillus subtilis* CCT 7678, o que corresponde a uma degradação de 20 % em relação a sua concentração inicial, já com *Corynebacterium aquaticum* a variação foi de 68 a 27 µg kg<sup>-1</sup>, o que corresponde a uma degradação de 60,3 % em relação ao inicial (Tabelas 2 e 3 – Apêndice 1), demonstrando que os biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium*

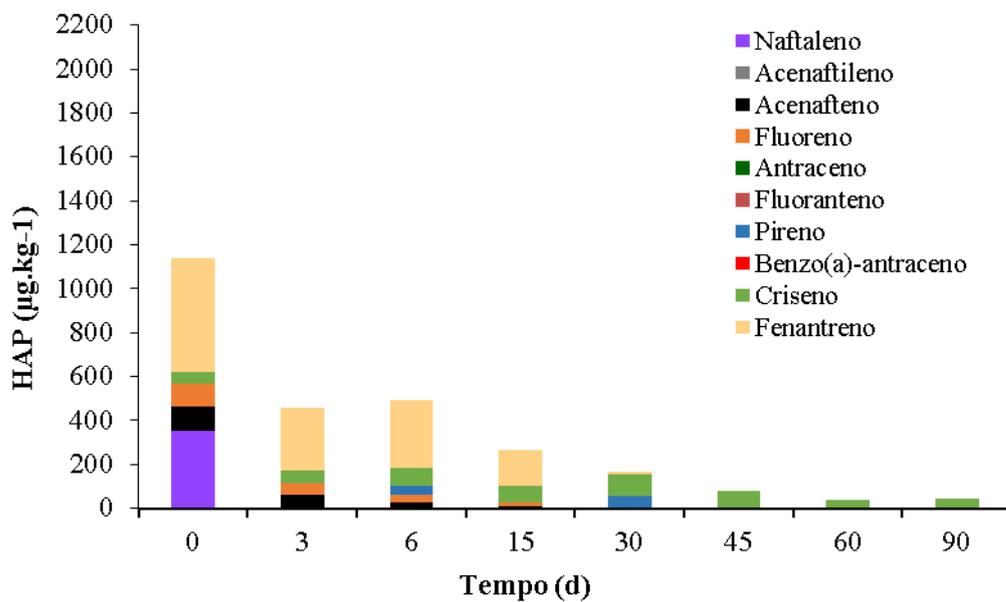
*aquaticum* proporcionaram uma maior disponibilidade do contaminante para a degradação pela biota nativa. De acordo com Leahy e Colwell (1990), os hidrocarbonetos diferem quanto à susceptibilidade ao ataque de micro-organismos. As taxas de biodegradação de hidrocarbonetos tem se mostrado mais altas para os saturados, seguidas pelos aromáticos de baixa massa molar e pelos aromáticos de alto massa molar. No caso dos HAP, geralmente, o aumento no número de anéis fusionados aumenta a estabilidade química e hidrofobicidade da molécula, tornando-a menos suscetível à biodegradação (KANALY; HARAYAMA, 2000). Manoli e Samara (1999) relataram que naftaleno, acenafteno e fluoreno, possuem 2 anéis benzênicos e massa molar 128,17, 154,21 e 166,22 g mol<sup>-1</sup>, respectivamente e o criseno, possui 4 anéis benzênicos e massa molar 228,29 g mol<sup>-1</sup>. O que justifica os resultados de degradação obtidos neste estudo.

Nas Figuras 9 (a) e (b), observa-se que a maioria dos HAP foram degradados em até 45 d de biorremediação do solo contaminado com óleo combustível. Somente pireno e criseno permaneceram durante os 90 d de ensaio. A variação do pireno foi de 162 a 127 µg kg<sup>-1</sup> com *Bacillus subtilis* CCT 7678, o que corresponde a uma degradação de 21,6 % em relação a sua concentração inicial. Com *Corynebacterium aquaticum*, a variação do pireno foi de 137 a 56 µg kg<sup>-1</sup>, correspondendo a uma degradação de 59,2 % em relação a concentração inicial. Para o criseno, a variação foi de 187 a 104 µg kg<sup>-1</sup> com *Bacillus subtilis* CCT 7678, sendo a porcentagem de degradação de 44,4 % em relação a quantidade inicial, já com *Corynebacterium aquaticum*, a variação foi de 178 a 67 µg kg<sup>-1</sup>, com degradação de 62,4 %, em relação a concentração inicial (Tabelas 2 e 3 – Apêndice 1). Do mesmo modo que no solo contaminado com petróleo, os biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum* apresentaram maiores taxas de degradação em solo contaminado com óleo combustível em relação aos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* CCT 7678. Entre os contaminantes avaliados, pireno e criseno são os compostos com maior número de anéis benzênicos e massa molar, sendo estas 202,25 e 228,29 g mol<sup>-1</sup>, respectivamente. De acordo com Chosson et al. (1991), a concentração e o tamanho da molécula de hidrocarboneto influenciam a susceptibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação. Ainda, o maior número de anéis aumenta a capacidade de sorção em partículas, levando a menor biodegradabilidade e maior potencial de acumulação (BRANDLI et al., 2004).

**Figura 8** - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado por petróleo: (a) ensaio com biossurfactante obtido de *Corynebacterium aquaticum* e (b) ensaio com biossurfactante obtido de *Bacillus subtilis* CCT 7678

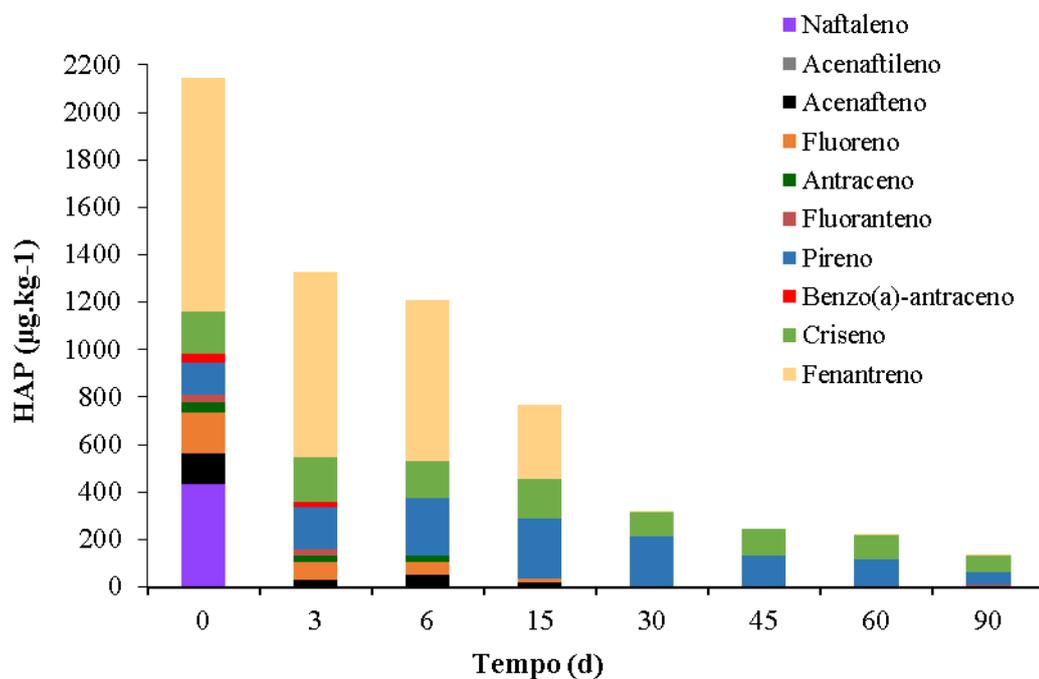


(a)

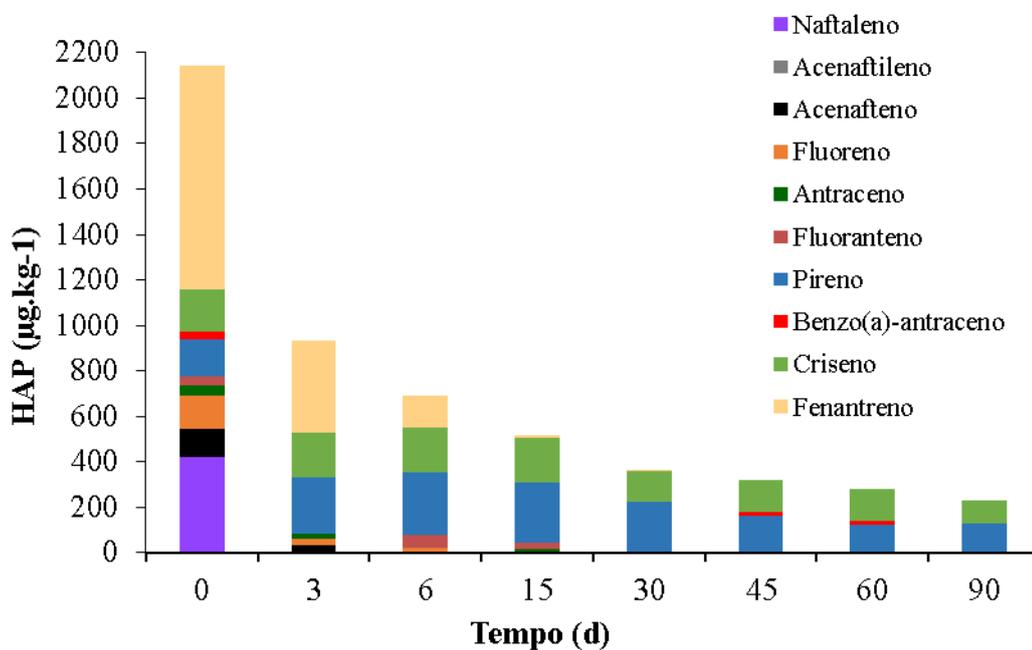


(b)

**Figura 9** - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado com óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de *Corynebacterium aquaticum* e (b) ensaio com biossurfactante obtido de *Bacillus subtilis* CCT 7678



(a)



(b)

Na Figura 9 (b) verifica-se que o benzo(a)-antraceno, apresentou oscilações durante o período de biorremediação com a utilização de biossurfactantes de *Bacillus subtilis* CCT 7678. Moran et al. (2000) relataram que alguns hidrocarbonetos podem estar sorvidos na

matriz do solo, impossibilitando o ataque microbiano, decorrente da baixa disponibilidade de contaminante. Na Tabela 3, observa-se que os biossurfactantes de *Bacillus subtilis* CCT 7678 apresentaram menor redução da tensão superficial e atividade emulsificante, comparado aos biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum*, o que fez com que o criseno e antraceno estivesse menos disponível para a biota nativa degradar. O decréscimo dessa tensão faz com que aumente a área de contato e a quebra dos compostos na forma de micela, diminuindo a área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água, facilitando a dispersão dos contaminantes no ambiente e sua consequente metabolização pelos micro-organismos presentes no meio (ZILIO et al., 2012).

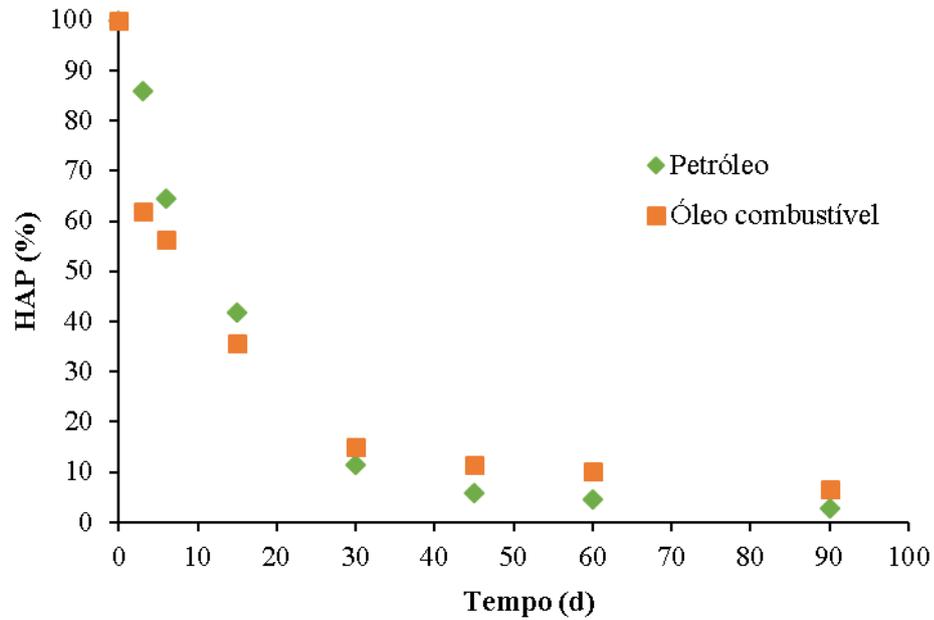
No metabolismo de xenobióticos, o citocromo P450 é indicado por Berrie et al. (2001), como responsável por reações de hidroxilação em bactérias e fungos. Na degradação aeróbica de HAP, ocorre a hidroxilação, evidenciando essa enzima na quebra do anel benzênico, liberando compostos de menor massa molar. Logo, quanto menor a cadeia, mais disponível estará o composto para a degradação microbiana. Ainda, é possível verificar que a quebra ocorre preferencialmente na posição *orto* e *meta* do anel benzênico, o que justifica a diminuição dos compostos de menor massa molar em ordem decrescente, conforme verificado no presente estudo. Assim o biossurfactante promoveu a entrada dos contaminantes para o interior das células dos micro-organismos da biota nativa facilitando a ação das enzimas OX - redutase inespecíficas e do citocromo P 450, como demonstrado pela diminuição nos níveis deles.

Na Figura 10 é apresentada a degradação dos HAP para os solos contaminados com petróleo e óleo combustível com adição de biossurfactantes extraídos das bactérias *Corynebacterium aquaticum* e *Bacillus subtilis* CCT 7678. Observa-se na Figura 17 que no solo contaminado com petróleo, houve maior taxa de degradação, comparado com o solo contaminado com óleo combustível, de modo que com os biossurfactantes extraídos de *Corynebacterium aquaticum* e de *Bacillus subtilis* CCT 7678 houve degradação de 97,3 % e 96,0 % dos HAP presentes no petróleo, respectivamente. No solo contaminado com óleo combustível, 93,5 % dos HAP foram degradados com a utilização dos biossurfactantes extraídos de *Corynebacterium aquaticum*, enquanto que 89,2 % dos compostos foram degradados com a utilização de biossurfactantes de *Bacillus subtilis* CCT 7678.

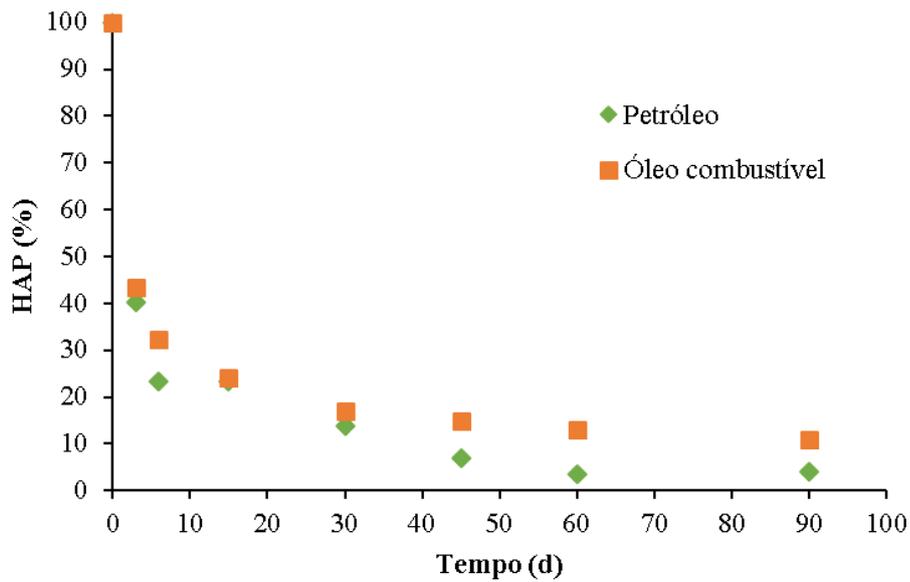
Os biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum* apresentaram maior redução da tensão superficial e atividade emulsificante, comparados com os biossurfactantes de *Bacillus subtilis* CCT 7678 (Tabela 3). Um biossurfactante que é capaz de obter maior redução da tensão superficial e atividade emulsificante torna o contaminante mais disponível

para o micro-organismo degradar, o que explica a maior eficiência na taxa de degradação de HAP de *Corynebacterium aquaticum*.

**Figura 10** - Degradação (%) de HAP em solos contaminados por petróleo e óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de *Corynebacterium aquaticum* e (b) ensaio com biossurfactante obtido de *Bacillus subtilis* CCT 7678



(a)



(b)

No presente estudo, os biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum* proporcionaram 97,3 % de degradação dos HAP presentes no solo contaminado com petróleo e 93,5 % de degradação dos HAP quando utilizado óleo combustível. Zilio et al. (2016) avaliaram a biorremediação *ex situ*, em solo argiloso de *Landfarming*, utilizando biossurfactantes produzidos por *Corynebacterium aquaticum*. Os autores verificaram que 93,8 % dos compostos HAP foram degradados em 90 d de biorremediação. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes ao obtido por Zilio et al. (2016), com os biossurfactantes produzidos pela mesma bactéria.

#### 4 CONCLUSÃO

Ambas as bactérias foram capazes de produzir biossurfactantes com características promissoras para tornar os HAP mais acessíveis ao metabolismo microbiano, sendo os melhores resultados de tensão superficial ( $30,4 \text{ mN m}^{-1}$ ) e atividade emulsificante (99,7 %) obtidos com *Corynebacterium aquaticum*. Os biossurfactantes produzidos pela *Corynebacterium aquaticum* foram mais efetivos na disponibilização do contaminante para a degradação pela biota nativa, tanto em solo contaminado com petróleo (97,3 %), quanto no óleo combustível (93,5 %), em relação aos biossurfactantes produzido pelo *Bacillus subtilis* CCT 7678, onde a degradação foi de 96,0 e 89,2 %, respectivamente.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171–179, 2006.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, p. 180-209, 1981.
- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-213, 1999.
- BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum-contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.
- BERRY, D. F.; FRANCIS, A. J.; BOLLAG, J. M. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 43-59, 1987.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BRANDLI, R.; KUPPER, T.; BUCHELI, T.; MAYER, J.; STADELMANN, F. X.; TARRADELLAS, J. **Occurrence and relevance of organic pollutants in compost, digestate and organic residues**. Literature review. EPF Lausanne – ENAC – ISTE – CECOTOX/Agroscope FAL Reckenholz, 2004.

CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v. 30, p. 31-71, 1984.

CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSERT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbons biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, v. 351, p. 640-642, 1991.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

CROSMAN, J. T.; PINCHUK, R. J.; COOPER, D. G. Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 467-472, 2002.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., Ed.; Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: technical manual. EPA 823 – B- 04-011, 2001.

ESCARRONE, A. L. V.; CALDAS, S.S.; FURLONG, E. B.; MENEGHETTI, V. L.; FAGUNDES, C. A. A.; ARIAS, J. L. O.; PRIMEL, E. G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 597-602, 2014.

EVANS, W. C. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. **Nature**, v. 270, p. 17-22, 1977.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 577-596, 1997.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2059-2067, 2000.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R.; Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**.8<sup>a</sup> Ed. New Jersey, Prentice-Hall., 606-768, 1997.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology**, v. 52. USA: Academic Press, Cap. 4, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 48–52, 1998.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 5, p. 1-19, 2011.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural water: sources, occurrence and analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 417-428, 1999.

MARTINS, R. G.; PINTO, M. H.; SILVA, M. A.; COSTA, J. A. V. **Biossurfactante bacteriano e fúngico: produção através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**. Artigo publicado no XXII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo-RS, 2007b.

MARTINS, R. G.; PINTO, M. H.; SILVA, M. A.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. **Influência do teor de umidade e estudo da condição de extração na produção de biossurfactante pela bactéria *Corynebacterium aquaticum* em processo fermentativo em estado sólido**. Resumo publicado no XIX Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2007a.

MARTINS, V. G. **Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M. ESTEVES, J. L.; SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Biodegradation**, v. 11, p. 65-71. 2000.

MOREIRA, M. S. F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, 626p. 2002.

PINTO, M. H. **Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa*

SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 172-179, 2008.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109-116, 2006.

SOUZA, K. C.; TANABE, A. K. R.; SABONARO, D. Z.; SMITH, W. S. Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos utilizando fungos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, p. 43-52, 2016.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. Ed. Edgard Blücher, 1973.

THOMAS, G. **Química medicinal – uma introdução**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

TRACY, J. W.; VANDE-VAA, E. A. **Xenobiotic metabolism**. In: Biochemistry and molecular biology of parasites. Academic Press. New York, 1995.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1329–1334, 2005.

ZILIO, R. L.; FURLONG, V. B.; OLIVEIRA, M. S.; RADMANN, E. M.; SANTOS, T. D.; TREICHEL, H.; COSTA, J. A. V. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon and total petroleum hydrocarbons using biosurfactants and chemical dispersant. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 6, p. 162-168, 2016.

ZILIO, R. L.; HOLZ, J. C. P.; GOULARTE, P. G.; RADMANN, E. M.; TREICHEL, H.; COSTA, J. A. V. Bioremediation of a sand soil contaminated by simulated spill of benzene, toluene and xylene. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 39-47, 2012.



## ARTIGO 2: BIOSSURFACTANTES DE MICROALGAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

### RESUMO

As microalgas são utilizadas tanto como alimento, quanto como fonte de compostos bioativos, como os biossurfactantes. Os biossurfactantes apresentam vasta aplicação, dentre estas, na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). O objetivo deste estudo foi produzir biossurfactantes a partir de diferentes cepas de microalgas e aplicar estes compostos no processo de biorremediação de HAP, provenientes de solos contaminados com petróleo e óleo combustível. As microalgas estudadas para a produção de biossurfactantes foram *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. Estas foram cultivadas em fotobiorreatores de 5 e 10 L. Com *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117, foram obtidos os melhores resultados de tensão superficial (25,3 e 28,3 mN m<sup>-1</sup>, respectivamente) e atividade emulsificante (78,6 e 97 %, respectivamente). Maiores taxas de degradação de HAP em solo contaminado com petróleo, foram obtidas com biossurfactantes de *Scenedesmus obliquus* LEB 117 (93,1 %). Para o solo contaminado com óleo combustível, 87,8 % dos HAP foram degradados quando foram utilizados biossurfactantes de *Chlorella fusca* LEB 111.

**Palavras-chave:** *Chlorella fusca*. Degradação de hidrocarbonetos. Emulsificante. *Scenedesmus obliquus*, Surfactante biológico.

### ABSTRACT

Microalgae are used both as food and as a source of bioactive compounds, such as biosurfactants. Biosurfactants present a wide application, among them, in the bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). The microalgae studied for the production of biosurfactants were *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 and *Synechococcus nidulans* LEB 115. These were grown in 5 and 10 L glass and plastic photobioreactors. The best results for surface tension obtained to *Chlorella fusca* LEB 111 and *Scenedesmus obliquus* LEB 117 were 25,3 e 28,3 mN m<sup>-1</sup>, respectively, and 78,6 e 97 % to emulsifying activity. Higher rates of PAH degradation in soil contaminated with petroleum were obtained with biosurfactants from *Scenedesmus obliquus* LEB 117 (93,1%). For soil contaminated with fuel oil, 87,8% of the PAH were degraded when using biosurfactants from *Chlorella fusca* LEB 111.

**Keywords:** Biological surfactant. *Chlorella fusca*. Emulsifier. Hydrocarbon degradation. *Scenedesmus obliquus*.

## 1 INTRODUÇÃO

A exploração, transporte e consumo do petróleo e seus derivados pode causar a liberação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP) no ambiente. Essa liberação pode ocorrer em menor quantidade pelo descarte inadequado ou infiltrações nos sistemas de armazenamento, ou em grande escala devido a derramamentos acidentais nos navios petroleiros, plataformas de petróleo e dutos. Desde o início da exploração do petróleo no século XIX, e sua rápida aceitação como fonte de energia, o petróleo e seus derivados tem recebido crescente demanda, o que aumentou a quantidade e a circulação desse composto no ambiente (PALA et al., 2006).

Uma estratégia para eliminação dos HAP dos solos contaminados é a biorremediação, que é a utilização de atividade biológica ou bioquímica para transformar os contaminantes em substâncias inertes (HOLLINGER et al., 1997). Esta biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BANFORTH; SINGLETON, 2005).

Uma limitação da biorremediação, é que muitos hidrocarbonetos são insolúveis em água, tornando-os menos disponíveis para os micro-organismos degradadores. Uma maneira de aumentar a biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos é a aplicação de biossurfactantes (CUBITO et al., 2004). De acordo com Zilio et al. (2012), os biossurfactantes interagem com os compostos presentes nos hidrocarbonetos e assim, aumentam a solubilidade dos mesmos em água. Desta forma, a presença de biossurfactantes, aumenta a disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos, e conseqüentemente à biorremediação.

Biossurfactantes são compostos com atividade tensoativa que compreendem ampla variedade de estruturas químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, lipídios neutros, ácidos graxos e fosfolipídios (DESAI; BANAT, 1997). Estudos relatam que microalgas são grandes produtoras de glicolipídios, fosfolipídios e lipídios neutros (BIGOGNO et al., 2002; CEVC, 1993; KOSARIC, 1992; RODOLFI et al., 2009; SZUHAI, 1989; XUE et al., 2002), o que justifica o estudo da produção de biossurfactantes por microalgas. Uma vantagem de cultivar microalgas para produção de biossurfactantes é que

muitas são GRAS (*Generally Recognized as Safe*). De acordo com o FDA, organismos com certificado GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade (FDA, 2002)

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactantes a partir de diferentes cepas de microalgas e aplicar estes compostos no processo de biorremediação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, provenientes de solos contaminados com petróleo e óleo combustível.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE**

#### **2.1.1 Crescimento e manutenção dos micro-organismos**

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. Todas as microalgas utilizadas neste estudo pertencem ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. As culturas foram mantidas em meio BG 11 (RIPPKA et al., 1979).

#### **2.1.2 Condições de cultivo**

Os cultivos das microalgas foram realizados em meio BG 11, com concentração de biomassa inicial  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ , em fotobiorreatores de vidro e plástico de 5 e 10 L. Os fotobiorreatores foram mantidos em estufa termostaticada (Modelo 347 CDG – FANEM, Brasil) a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h claro/escuro e iluminância de 3200 lux, durante 10 d. A agitação das culturas foi realizada pela injeção de ar estéril com vazão específica de 0,5 vvm (COSTA et al., 2000).

#### **2.1.3 Determinação da Concentração celular**

A concentração de biomassa foi determinada, a cada 24 h, por medida de densidade ótica das amostras em espectrofotômetro a 670 nm (Quimis Q798DRM, Brasil), utilizando curva padrão que relaciona densidade ótica com massa seca de biomassa (COSTA et al., 2002).

## 2.2 EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A biomassa produzida pelas microalgas foi separada por centrifugação a 9200 x g por 15 min (Centrifuga modelo CR 22GIII – Hitachi, Japão). Após, a biomassa foi liofilizada (Liofilizador Modelo 64132 – Labconco, USA) (Figura 1) e os biossurfactantes foram extraídos utilizando clorofórmio:metanol (1:2) segundo método de Bligh e Dyer (1959). A seguir, as amostras foram submetidas ao rompimento da parede celular em agitador de tubos (5 min) e banho ultrassônico contendo quartzo (Modelo Q3350 – Quimis, Brasil) (20 min). Posteriormente as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores (Centrifuga modelo CR 22GIII – Hitachi, Japão) e o sobrenadante foi submetido à evaporação (Evaporador rotativo modelo Q 344-B2 – Quimis, Brasil) do solvente. O extrato foi ressuspenso em água à temperatura ambiente seguindo a proporção de 0,1:7,5 (biomassa:água), obtendo-se os extratos contendo os biossurfactantes (RADMANN, 2011).

**Figura 1** – Liofilização das microalgas



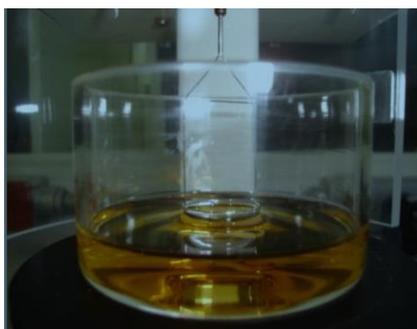
## 2.3 AVALIAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

### 2.3.1 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial do extrato foi determinada em tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9) de fabricação alemã, usando o método do anel Du Nouy, conforme Figura 2. Este tensiômetro determina tensões superficiais e interfaciais com a ajuda de um anel suspenso e fixado em uma balança de precisão. A amostra líquida foi colocada em recipiente

específico do equipamento, o anel foi mergulhado no líquido e zerado. O anel foi então abaixado, de forma que o filme líquido produzido abaixo do anel foi alongado. Quando o filme líquido foi estendido, a força máxima foi determinada e medida, obtendo-se a tensão superficial. A tensão superficial foi determinada com a amostra em contato com o ar (COSTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006).

**Figura 2** - Medição da tensão superficial em tensiômetro.



### 2.3.2 Atividade emulsificante

A atividade emulsificante água em óleo ( $AE_{o/w}$ ) do extrato foi determinada de acordo com o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). O extrato contendo o biosurfactante foi homogeneizado com óleo de girassol com auxílio de agitador de tubos (modelo AP 56 –Phenix, Brasil) e mantido em repouso por 24 h. A atividade emulsificante foi calculada pela Equação (1). Na Figura 3 é apresentado o esquema do teste de atividade emulsificante.

$$AE (\%) = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}} \quad (1)$$

**Figura 3** - Teste de atividade emulsificante.



FONTE: Adaptado de Martins (2005).

## 2.4 TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados de tensão superficial e atividade emulsificante foram avaliados por meio da diferença de médias (teste de Tukey) ao nível de significância de 5 %, em relação aos diferentes biossurfactantes produzidos.

## 2.5 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS

### 2.5.1 Coleta da amostra de solo

A coleta do solo arenoso foi realizada na localidade do Arraial, Rio Grande (RS) com as seguintes localizações, latitude 29°50'043"S e longitude 50°31'216"W. Peneiras de 4,00 a 0,062 mm foram utilizadas e a massa retida em cada uma das peneiras foi comparada à Escala de Wentworth para classificação do solo (Tabela 1) (SUGUIO, 1973).

**Tabela 1** - Análise granulométrica do solo arenoso utilizado

Tyler	Abertura (mm)	Classificação
-5+9	4,00 a 2,00	Grão
-9+16	1,68 a 1,00	Areia muito grossa
-16+32	0,84 a 0,50	Areia grossa
-32+60	0,42 a 0,250	Areia média
-60+115	0,21 a 0,125	Areia fina
-115+250	0,105 a 0,062	Areia muito fina

### 2.5.2 Determinação de fungos e bactérias totais no solo

Em condições assépticas, foi pesado 25 g de solo e homogeneizado em blender, com 225 mL de água peptonada 0,1 %. A partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ), foram preparadas diluições seriadas até  $10^{-5}$ .

Após, para a determinação de fungos totais, foi inoculado, em triplicata, 0,1 mL de amostra em ágar Dicloran Rosa de Bengala (DRBC), seguido de incubação a 25 °C por 5 d (NEUSELY et al., 2010). Para a determinação de bactérias totais, em triplicata, foi inoculado

0,1 mL de amostra em ágar Padrão para Contagem (PCA), seguido de incubação a 35 °C por 48 h (NEUSELY et al., 2010). Todos os materiais e meios utilizados foram previamente esterilizados a 121 °C por 15 min.

## 2.6 PREPARAÇÃO DO ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO

### 2.6.1 Homogeneização

Em frasco com capacidade de 3000 g foi adicionado 1868,75 g de solo arenoso não estéril e 625 g de solo arenoso seco à 105 °C. A umidade do solo para o processo de biorremediação foi determinada de acordo com AOAC (2000) e corrigida a 11 %, semanalmente, com água destilada estéril. O solo foi contaminado com 0,25 % (m m<sup>-1</sup>) do poluente (óleo combustível ou petróleo), de acordo com Epa (2001). Após, as amostras foram submetidas à homogeneização (Agitador rotatório TE – 33I EI - Tecnal, Brasil) durante 2 h a 30 rpm, conforme Figura 4. O volume de biossurfactante utilizado em cada ensaio foram determinados de acordo com as Equações (2) e (3) (Tabela 2).

**Figura 4** - Homogeneização das amostras para biorremediação.



$$m_{\text{óleo de girassol emulsificado}} = m_{\text{óleo de girassol total}} \times AE \quad (2)$$

$$VB_{\text{biorremediação}} = \frac{m_{\text{contaminante}} \times VB_{\text{atividade emulsificante}}}{m_{\text{óleo de girassol emulsificado}}} \quad (3)$$

Em que: m = massa (g); AE = atividade emulsificante (%);  $VB_{\text{biorremediação}}$  = volume de biossurfactante utilizado na biorremediação do contaminante (mL);  $VB_{\text{atividade emulsificante}}$  = volume de biossurfactante utilizado na determinação da atividade emulsificante (mL).

**Tabela 2** – Delineamento experimental da biorremediação

Reatores	Micro-organismos	Óleo (%)	Petróleo (%)	Biossurfactante (mL)
Reator 1	<i>C. fusca</i> LEB 111	0,25	-	6,26
Reator 2	<i>C. fusca</i> LEB 111	-	0,25	6,26
Reator 3	<i>S. obliquus</i> LEB 117	0,25	-	5,05
Reator 4	<i>S. obliquus</i> LEB 117	-	0,25	5,05

## 2.7 BIORREMEDIAÇÃO

No processo de biorremediação foram utilizados 5 biorreatores de vidro, sendo 1 sem uso de contaminante para determinação de umidade, com dimensões de 250 mm x 250 mm x 250 mm (Figura 5). Em cada biorreator foram adicionados 2500 g de amostra proveniente da homogeneização, conforme o item 2.6.1. Os ensaios foram realizados na parte externa do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, em ambiente aberto expostos às condições ambientais naturais, tanto de temperatura quanto umidade e suas variações. A biorremediação ocorreu durante 90 dias.

**Figura 5** - Biorreator de vidro utilizado no processo de biorremediação.



Os ensaios de biorremediação foram avaliados por 3 meses, sendo coletadas amostras nos dias 0, 3, 6, 15, 30, 45, 60 e 90 para a análise dos hidrocarbonetos. Os pontos coletados foram selecionados aleatoriamente. As amostras foram congeladas a -80 °C (New

Brunswick Scientific Modelo U 535-86, England) e liofilizadas (Liofilizador Modelo 64132 – Labconco, USA), em seguida foram armazenadas a -18 °C e posteriormente analisadas.

## 2.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS PARA A BIORREMEDIAÇÃO

### 2.8.1 Determinação de pH e temperatura

Em cada uma das coletas foi verificada a temperatura ambiente e do solo. A determinação do pH do solo foi realizada por eletrodo combinado de vidro tipo baioneta com leitura expressa em escala  $\pm 0,01$  e o pH medido com a utilização de pHmetro digital portátil (Modelo Mettler AG 8603 – Toledo, Alemanha). A temperatura do solo foi medida com termômetro de mercúrio, com escala 0,1. A temperatura ambiente foi determinada com termômetro de mercúrio com máximo e mínimo (Icotermin).

### 2.8.2 Determinação de hidrocarbonetos

As amostras para a determinação dos hidrocarbonetos foram liofilizadas (Liofilizador Modelo 64132 – Labconco, USA) e moídas em gral. Após, foram acondicionadas em papel alumínio previamente calcinado em mufla a 450 °C. A seguir, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Compostos Orgânicos e Metais da FURG, onde foram realizadas as determinações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), em cromatógrafo gasoso (GC–EI–MS QP2010 Plus, Shimadzu, Japão), com coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Restek, Bellefonte, USA), acoplado a um detector espectrométrico de massas com filtro quadrupolar, segundo método descrito por Escarrone et al. (2014). Os HAP determinados foram: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)-antraceno e criseno.

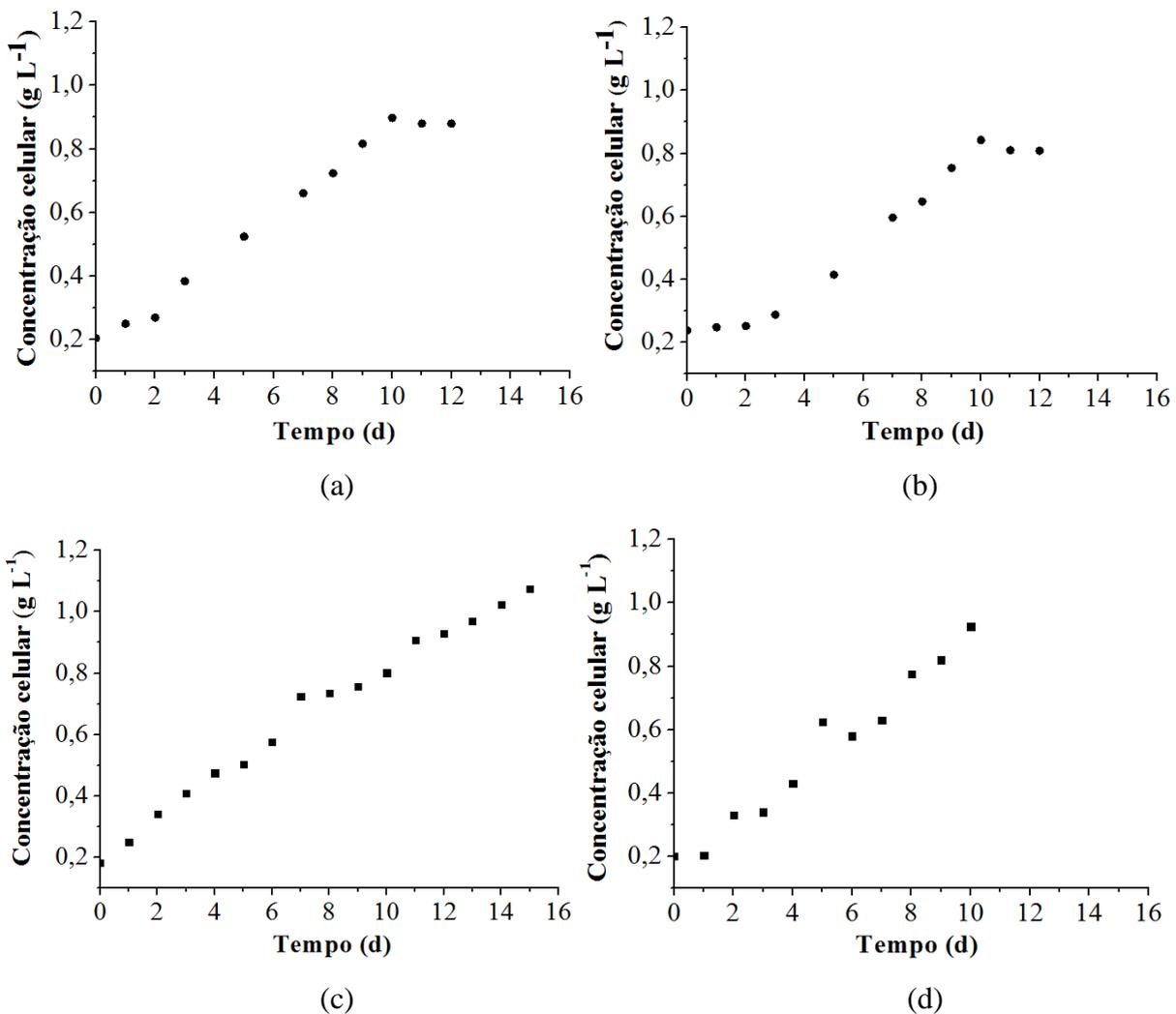
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A Figura 6 apresenta as curvas de crescimento das microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmos obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. Verifica-se que a concentração celular máxima foi obtida no tempo de

10 d para *Chorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117 e *Synechococcus nidulans* LEB 115. Porém, para a microalga *Scenedesmus actus* LEB 116, a concentração máxima de biomassa foi obtida em 15 d. A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano (MAKKAR; CAMEOTRA, 2001). Dessa forma, a extração dos biossurfactantes foi realizada após 10 d de cultivo.

**Figura 6** - Curvas de crescimento das microalgas (a) *Chlorella fusca* LEB 111, (b) *Scenedesmos obliquus* LEB 117, (c) *Scenedesmus actus* LEB 116 e (d) *Synechococcus nidulans* LEB 115



Verifica-se na Tabela 3, que resultados satisfatórios foram observados para os biossurfactantes produzidos pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117, com capacidade de reduzir a tensão superficial para 25,3 e 28,3 mN m<sup>-1</sup>, respectivamente. Os biossurfactantes das microalgas *Scenedesmus actus* LEB 116 e

*Synechococcus nidulans* LEB 115, foram capazes de reduzir a tensão superficial para 43,1 e 42,8 mN m<sup>-1</sup>, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por Radmann et al. (2015) com a microalga *Arthrospira* sp. LEB 18, onde a redução da tensão superficial foi de 43 mN m<sup>-1</sup>. Batista et al. (2006) relatam que existem diversos critérios para a seleção de biossurfactantes, dentre estes, que o bioproduto apresente tensão superficial inferior a 40 mN m<sup>-1</sup> e que mantenha pelo menos 50 % do volume da emulsão original, 24 h depois da sua formação. Diante disto, optou-se em seguir o estudo com biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, somente com as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117.

**Tabela 3** - Tensão superficial dos biossurfactantes produzidos pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111, *Scenedesmus obliquus* LEB 117, *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115

Micro-organismo	Tensão superficial* (mN m <sup>-1</sup> )
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	25,3 ± 0,4 <sup>c</sup>
<i>Scenedesmus obliquus</i> LEB 117	28,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
<i>Scenedesmus actus</i> LEB 116	43,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
<i>Synechococcus nidulans</i> LEB 115	42,8 ± 0,1 <sup>a</sup>

\*Média ± Desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Em relação a atividade emulsionante, *Scenedesmus obliquus* LEB 117 foi significativamente mais eficaz em relação a *Chlorella fusca* LEB 111 (78,6 ± 0,1 %), sendo capaz de emulsificar 97,0 ± 0,4 % do óleo. Shepherd et al. (1995) obtiveram com *Porphyridium cruentum* e *Spirulina* spp. 100 e 47 % de atividade emulsionante, respectivamente.

Há poucos relatos na literatura a respeito da produção de biossurfactantes por microalgas, mas vários autores demonstram a produção de compostos como glicolipídios, fosfolipídios e lipídios neutros por microalgas (BIGOGNO et al., 2002; BOROWITZKA, 1988; CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2014; CEVC, 1993; CHAUTON et al., 2004; KOSARIC, 1992; RADMANN et al., 2015; RODOLFI et al., 2009; SZUHAI, 1989; XUE et al., 2002), que podem ser classificados como biossurfactantes. Segundo Borowitzka (1988), dentre as microalgas, as maiores produtoras de glicolipídios e fosfolipídios são as cianobactérias e as clorofíceas, respectivamente. De acordo com Cevc (1993) a microalga *Scenedesmus* sp. contém 41 % de fosfolipídios.

Geralmente, biossurfactantes de baixo massa molar são reconhecidos por reduzir a tensão superficial entre óleo e água, enquanto que biossurfactantes de alto massa molar são identificados por suas propriedades emulsificantes (AL-WAHAIBI et al., 2014). Diante disto, supõe-se que os biossurfactantes obtidos pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117 sejam de baixo e alto massa molar, respectivamente, em virtude de seus valores de tensão superficial e atividade emulsificante. Já os biossurfactantes produzidos por *Scenedesmus actus* LEB 116 e *Synechococcus nidulans* LEB 115, possivelmente sejam de alto massa molar, decorrente da tensão superficial resultante.

A surfactina produzida por *Bacillus* spp. é conhecida como um dos mais efetivos biossurfactantes, pois pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m<sup>-1</sup>. Neste estudo, resultados semelhantes foram obtidos para os biossurfactantes produzidos pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117.

### 3.2 BIORREMEDIAÇÃO

A aplicação dos biossurfactantes foi realizada no período de novembro/2015 a fevereiro/2016. Com o peneiramento do solo, foi verificado que 70,56 % em massa foi retido em peneira de 0,250 mm, sendo este solo classificado como areia média (Tabela 1).

A biorremediação foi realizada *ex situ* durante 90 d utilizando solos contaminados com hidrocarbonetos (petróleo ou óleo combustível) e adicionados de biossurfactantes obtidos das microalgas *Chlorella fusca* e *Scenedesmus obliquus*, em sistema aberto exposto às condições ambientais naturais tanto de temperatura, quanto umidade e pressão. A umidade foi monitorada ao longo do processo de biorremediação, sendo está, mantida constante entre 11 e 12 %, corrigida semanalmente.

O solo contém uma série de micro-organismos capazes de metabolizar compostos de petróleo. Na Tabela 4, observa-se a concentração de fungos e bactérias presentes no solo utilizado para o processo de biorremediação.

**Tabela 4** - Contagem de micro-organismos nativos presentes no solo

Micro-organismo	Contagem (UFC g <sup>-1</sup> )
Fungos totais	3,9 x 10 <sup>4</sup>
Bactérias totais	7,3 x 10 <sup>5</sup>

UFC: Unidades Formadoras de Colônia.

Na Tabela 5 é apresentada a variação de pH e temperatura, durante o processo de biorremediação. A maior variação de pH detectado no processo de biorremediação, ocorreu no ensaio em que o solo foi contaminado por óleo combustível, com a utilização dos biossurfactantes de ambas as microalgas. O óleo combustível possui maior concentração de hidrocarbonetos, estando esse mais suscetível a biodegradação por micro-organismos e consequentemente maior formação de ácidos orgânicos, ocasionando assim, maior variação no pH.

**Tabela 5** - Valores máximos e mínimos para os parâmetros avaliados para HAP

Ensaio	pH		Temperatura (°C)		
	Óleo combustível	Petróleo	Ambiente		Solo
			Mínima	Máxima	
<i>Chlorella fusca</i>	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,1	20 ± 3	26 ± 4	23 ± 2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	5,0 ± 0,3	5,3 ± 0,1			

O pH manteve-se levemente ácido em todos os ensaios, com variação de 5,6 a 4,6. Provavelmente esta variação ocorreu pela ação do biossurfactante, aumentando a superfície de contato e por consequência, facilitando a ação dos micro-organismos (ZILIO et al., 2016). Nesse processo, ácidos orgânicos podem ser acumulados (AISLABIE et al., 2006), como mostra a Tabela 5, reduzindo o valor do pH e indicando elevada atividade microbiana.

Em geral, a temperatura ótima para a atividade de micro-organismos mesófilos se situa na faixa entre 25 e 30 °C, embora ainda sejam capazes de manter o seu metabolismo ativo em temperaturas um pouco acima ou abaixo dessa faixa, de modo mais lento (MADIGAN et al., 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A temperatura do solo permaneceu em torno de 23 °C e a ambiente variou de 20 a 26 °C (Tabela 5). Segundo Atlas (1981), a temperatura possui um efeito significativo sobre as taxas de degradação de hidrocarbonetos, devido à sua influência sobre fatores físicos como a viscosidade do óleo. Ainda, a viscosidade é menor em temperaturas mais altas, aumentando assim a chance de emulsificação, bem como a área superficial disponível para atividades microbianas e solubilização. A diminuição da temperatura reduz a atividade microbiana, principalmente pelo enfraquecimento das ligações entre as proteínas, o que compromete a fluidez da membrana celular e, por conseguinte, a entrada de nutrientes e saída dos produtos do metabolismo. Por outro lado, o aumento da

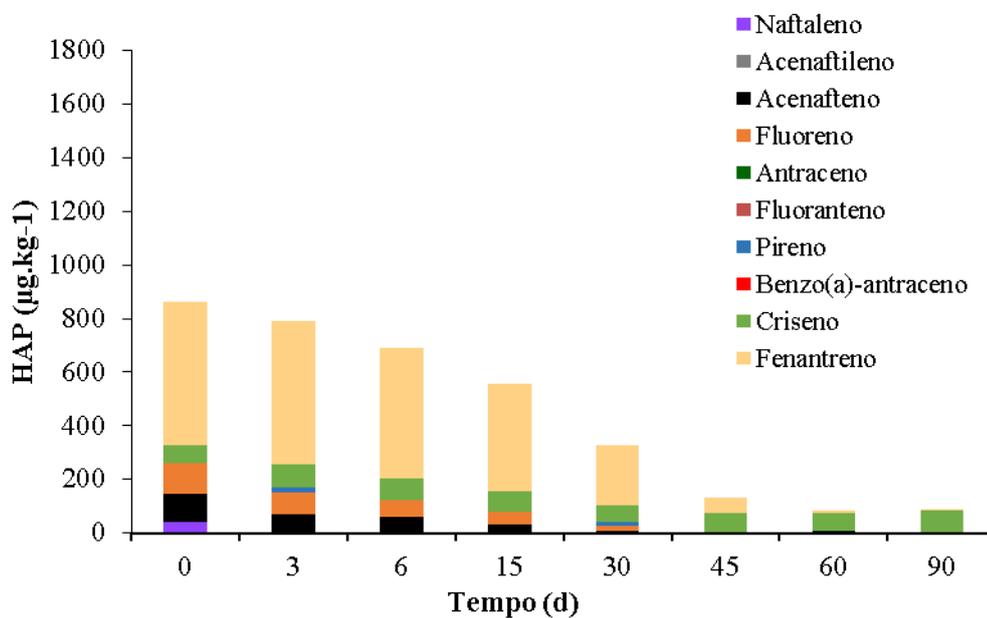
temperatura provoca a desnaturação das proteínas celulares (enzimas) inviabilizando as reações metabólicas (MADIGAN et al., 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Com relação à degradação de hidrocarbonetos presentes no solo contaminado com petróleo, pode ser observado que as concentrações de HAP diminuíram ao longo dos 90 d de biorremediação (Figura 7). A utilização dos biossurfactantes produzidos pelas duas microalgas estudadas apresentou resultados semelhantes, sendo o naftaleno o HAP degradado em menor tempo (6 d) (Tabelas 4 e 5 – Apêndice 1). Já o criseno e o fenantreno, foram os compostos com menor biodegradação. O criseno se manteve em maior concentração em 90 d. A variação do criseno foi de 68 a 83  $\mu\text{g kg}^{-1}$  com *Chlorella fusca* LEB 111. O provável aumento da concentração final de criseno no processo de biorremediação, pode ser decorrente do mesmo estar adsorvido ao solo, diminuindo a sua disponibilidade para ação do biossurfactante e conseqüentemente limitando a atividade microbiana, para a sua degradação. Com *Scenedesmus obliquus* LEB 117 a variação de criseno foi de 68 a 61  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , correspondendo a uma degradação de 10,3 %, em relação a concentração inicial (Tabelas 4 e 5 – Apêndice 1).

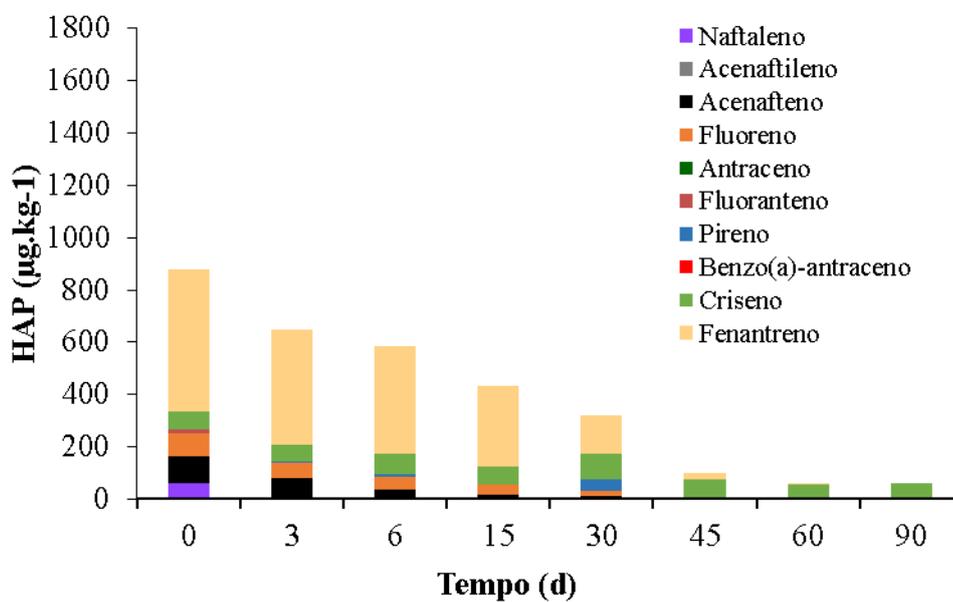
De acordo com Leahy e Colwell (1990), os hidrocarbonetos diferem quanto à susceptibilidade ao ataque de micro-organismos. Hidrocarbonetos saturados apresentam maior taxa de biodegradação, seguidos pelos aromáticos de baixo massa molar e pelos aromáticos de alto massa molar. Além disso, geralmente, o aumento no número de anéis fusionados aumenta a estabilidade química e hidrofobicidade da molécula de HAP, tornando-o menos suscetível à biodegradação (KANALY; HARAYAMA, 2000). Manoli e Samara (1999), relatam que o naftaleno e o acenafteno possuem dois anéis benzênicos, enquanto que fenantreno, possui três anéis e o criseno e benzo (a)-antraceno possuem quatro anéis benzênicos. Além do tamanho da molécula, a contração do contaminante no meio também influencia no tempo de biodegradação (CHOSSON et al., 1991).

Na Figura 8 observa-se que na biodegradação de HAP do solo contaminado com óleo combustível ocorreu diferença entre os ensaios com biossurfactantes extraídos das duas microalgas. Em relação ao naftaleno, com o uso de biossurfactantes de *Chlorella fusca* LEB 111, a degradação ocorreu em menor tempo (menos de 3 d), comparada com a utilização do biossurfactante de *Scenedesmus obliquus* LEB 117 (até 6 d).

**Figura 7** - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado com petróleo: (a) ensaio com biossurfactante obtido de *Chlorella fusca* LEB 111e (b) ensaio com biossurfactante obtido de *Scenedesmus obliquus* LEB 117

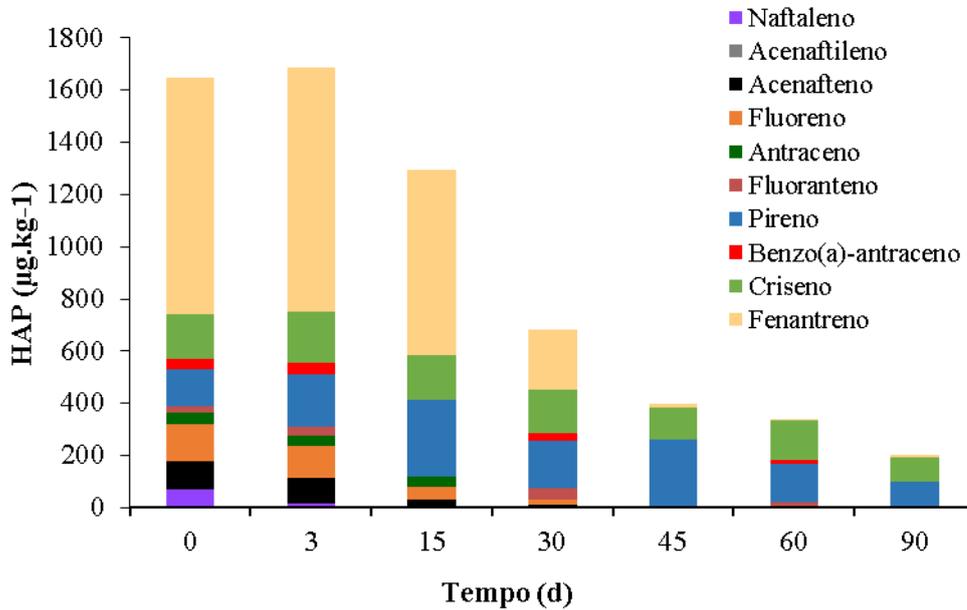


(a)

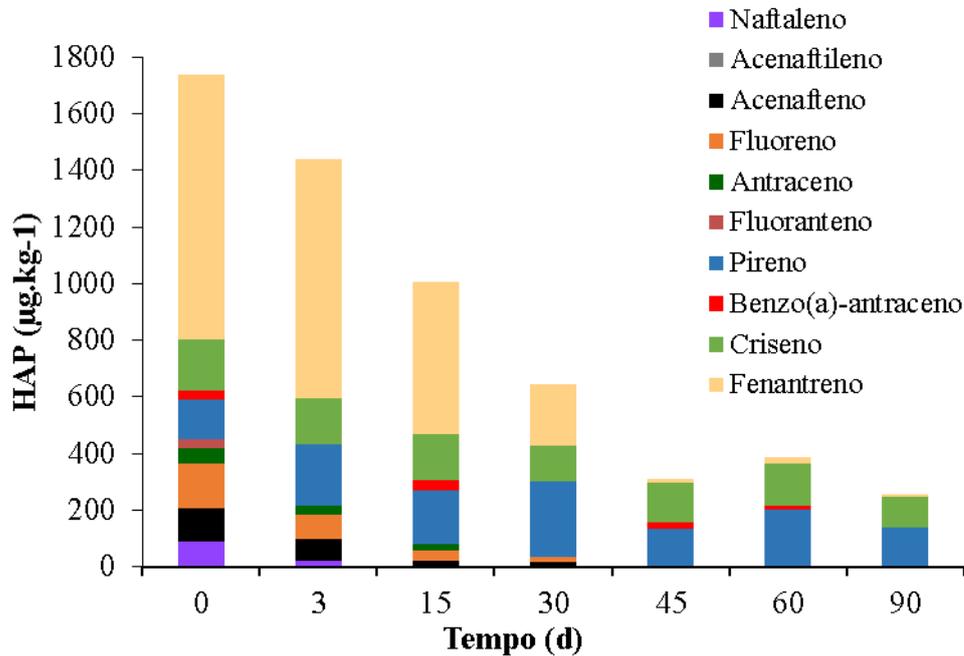


(b)

**Figura 8** - Concentração de HAP ao longo do tempo, em solo contaminado com óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de *Chlorella fusca* LEB 111e (b) ensaio com biossurfactante obtido de *Scenedesmus obliquus* LEB 117



(a)



(b)

Os biossurfactantes de *Chlorella fusca* LEB 111 possuem tensão superficial menor que os biossurfactantes de *Scenedesmus obliquus* LEB 117, com 25,3 e 28,3  $\text{mN m}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 2), ocasionando melhor interação com os HAP presentes no solo contaminado. Zilio et al. (2012) relatam que os biossurfactantes interagem com os compostos

presentes nos hidrocarbonetos e assim, aumentam a solubilidade dos mesmos em água. Desta forma, a presença de biossurfactantes, aumenta a disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos, e conseqüentemente à biorremediação.

Em relação ao pireno e ao criseno, a degradação foi mais lenta para ambas as microalgas, sendo que estes contaminantes se mantiveram presentes durante todo o período da biorremediação. A variação do criseno foi 173 a 94  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , com *Chlorella fusca* LEB 111, o que corresponde a 45,7 % de degradação, em relação a concentração inicial. Para a microalga *Scenedesmus obliquus* LEB 117, a variação de criseno foi 179 a 109  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , correspondendo a 39,1 % de degradação, em relação a concentração inicial. Em relação ao pireno, a variação com *Chlorella fusca* LEB 111 foi 140 a 93  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , correspondendo a 35,6 % de degradação. Com *Scenedesmus obliquus* LEB 117 a concentração de pireno manteve-se constante durante todo o período de biorremediação, permanecendo no final do processo com a mesma concentração da amostra inicial (138  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Tabelas 4 e 5 – Apêndice 1).

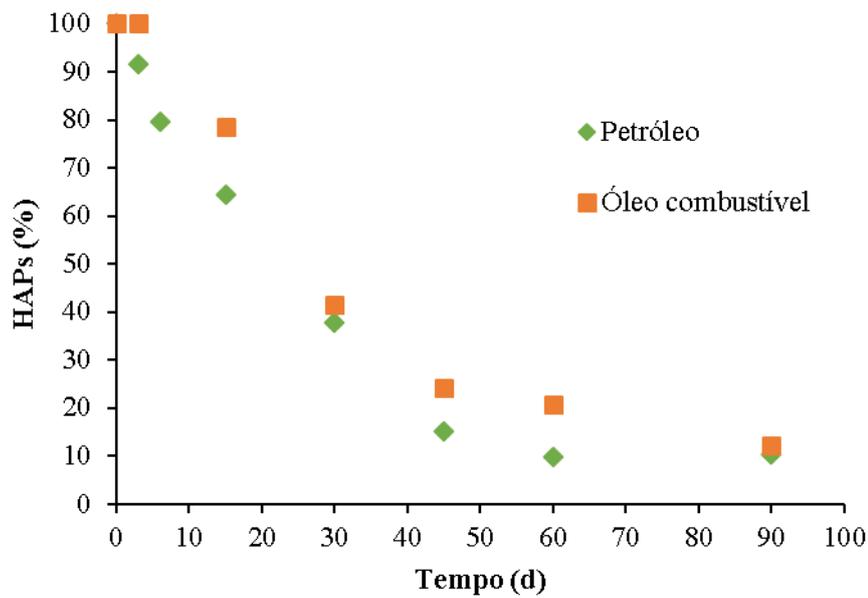
Em relação aos HAP presentes, pireno e criseno são os compostos de maior massa molar analisados neste estudo, com 202,25 e 228,29  $\text{g mol}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com Chosson et al. (1991) a concentração e o tamanho da molécula de hidrocarboneto influenciam a suscetibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação. Ainda, o maior número de anéis aumenta a capacidade de sorção em partículas, levando a menor biodegradabilidade e ao maior potencial de acumulação (BRANDLI et al., 2004).

Pode-se observar na Figura 8 que a concentração de alguns HAP apresentou oscilações ao longo dos 90 d de biorremediação. Durante a correção da umidade no processo de biorremediação, pode ter havido a liberação dos compostos adsorvidos no meio, possibilitando maior ação dos biossurfactantes e conseqüentemente, maior disponibilidade dos contaminantes para a microbiota nativa. Johnsen et al. (2005) relatam que a degradação dos HAP no solo pode ser limitada pela incapacidade dos micro-organismos em metabolizar eficientemente estes compostos, dado a sorção do contaminante à fase sólida mineral e orgânica do solo.

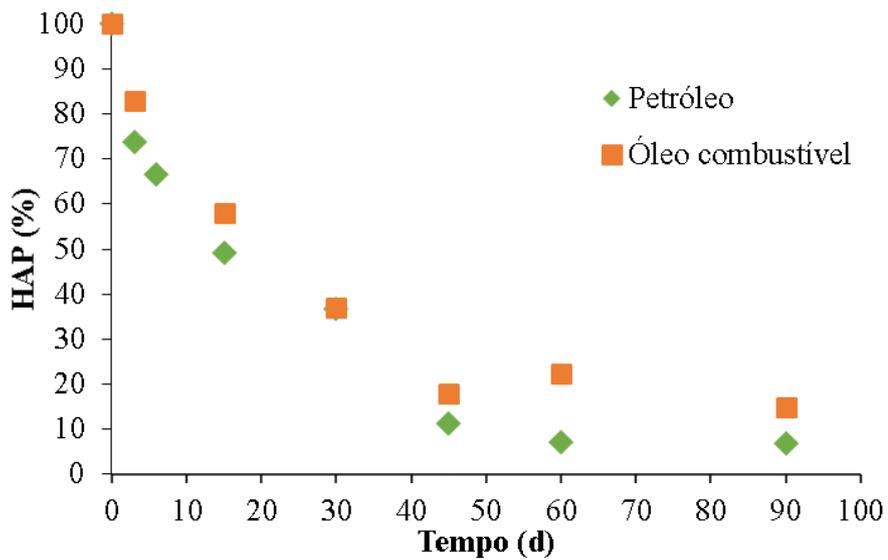
No metabolismo de xenobióticos, o citocromo P450 é indicado por Berrie et al. (2001), como responsável por reações de hidroxilação em bactérias e fungos. Na degradação aeróbica de HAP, ocorre a hidroxilação, evidenciando essa enzima na quebra do anel benzênico, liberando compostos de menor massa molar. Logo, quanto menor a cadeia, mais disponível estará o composto para a degradação microbiana. Ainda, é possível verificar que a quebra ocorre preferencialmente na posição *orto* e *meta* do anel benzênico. O que justifica a diminuição dos compostos de menor massa molar em ordem decrescente, conforme verificado

em nosso estudo. Acredita-se que o biossurfactante promova a entrada dos contaminantes para o interior das células dos micro-organismos da biota nativa facilitando a ação das enzimas OX-redutase inespecíficas e do citocromo P 450.

**Figura 9** - Degradação (%) de HAP em solos contaminados por petróleo e óleo combustível: (a) ensaio com biossurfactante obtido de *Chlorella fusca* LEB 111e (b) ensaio com biossurfactante obtido de *Scenedesmus obliquus* LEB 117



(a)



(b)

Na Figura 9 é apresentada a degradação dos HAP para os solos contaminados com petróleo e óleo combustível com adição de biossurfactantes extraídos das microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117.

No solo contaminado com petróleo, a degradação no fim do processo de biorremediação, utilizando biossurfactantes extraídos de *Chlorella fusca* LEB 111 foi 79,3 %. A degradação foi 93,1 % quando foram utilizados biossurfactantes obtidos de *Scenedesmus obliquus* LEB 117 (Figura 9).

A maior degradação obtida no ensaio com biossurfactantes de *Scenedesmus obliquus* LEB 117, deve-se provavelmente a maior atividade emulsificante (97 %), comparada com a atividade emulsificante de *Chlorella fusca* LEB 111 (78,6 %) (Tabela 7). Acredita-se que maior atividade emulsificante possibilite maior tempo de emulsão, e conseqüentemente, maior disponibilidade dos HAP à biota nativa.

No solo contaminado com óleo combustível, os biossurfactantes das duas microalgas obtiveram comportamento semelhante na biodegradação de HAP, sendo que a degradação foi 87,8 % e 85,2 % para os ensaios com biossurfactantes extraídos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117, respectivamente.

No contexto geral, a biorremediação com biossurfactantes de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117 foi eficaz na degradação dos compostos analisados, tanto em solo contaminado com petróleo, quanto em solo contaminado com óleo combustível.

#### **4 CONCLUSÃO**

Com as microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117 foi possível produzir biossurfactantes com baixos valores de tensão superficial (25,3 e 28,3 mN m<sup>-1</sup>, respectivamente) e elevada atividade emulsificante (78,6 e 97,0 %, respectivamente).

Além disso, foram eficazes na biodegradação de HAP, tanto em solo arenoso contaminado com petróleo, quanto no solo arenoso contaminado com óleo combustível. No solo contaminado com petróleo, a degradação com uso dos biossurfactantes da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi de 79,3 %, já para a microalga *Scenedesmus obliquus* LEB 117, a degradação foi de 93,1 %. No solo contaminado com óleo combustível, a degradação com uso dos biossurfactantes de *Chlorella fusca* LEB 111 foi de 87,8 % e para a microalga *Scenedesmus obliquus* LEB 117 foi de 85,2 %.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171–179, 2006.
- AL-WAHAIBI, Y. M.; JOSHI, S. J.; AL-BAHRY, S. N.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2014.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, p. 180-209, 1981.
- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-213, 1999.
- BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p.723-736, 2005.
- BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum-contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.
- BERRIE, J. W.; WILLIAMS, R. A. D.; SMITH, K. E. Microbial transformations of steroids – XII. Progesterone hydroxylation profiles are modulated by translational modification of an electron transfer protein in *Streptomyces roseochromogenes*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 77, p. 87-96, 2001.
- BERRY, D. F.; FRANCIS, A. J.; BOLLAG, J. M. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 43-59, 1987.
- BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, p. 497–503, 2002.
- BLIGH, E. G.; DYER, W.T. A method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 77, p. 911–917, 1959.
- BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of culture. In: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J., eds, **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 456-465, 1988.
- BRANDLI, R.; KUPPER, T.; BUCHELI, T.; MAYER, J.; STADELMANN, F. X.; TARRADELLAS, J. **Occurrence and relevance of organic pollutants in compost, digestate and organic residues**. Literature review. EPF Lausanne – ENAC – ISTE – CECOTOX/Agroscope FAL Reckenholz, 2004.

- CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Evaluation of the influence of nitrogen and phosphorus nutrients in the culture and production of biosurfactants by microalga *Spirulina*. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, p. 90-98, 2014.
- CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v. 30, p. 31-71, 1984.
- CEVC, G. **Phospholipids – Handbook**. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 1993.
- CHAUTON, M. S.; STORSETH, T. R.; KRANE, J. Analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), and comparison with analysis of lipophilic extracts. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 611-618, 2004.
- CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSORT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbons biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, v. 351, p. 640-642, 1991.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- CORSEUIL, H. X. Influência do receptor de elétrons na biorremediação de águas subterrâneas contaminadas por derramamentos de gasolina. **VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol. 1, p.68-75, 1994.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002
- COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; ARRIECHE, L.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.
- CUBITO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; CHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SIÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, v. 15, p. 281-287, 2004.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses: technical manual. EPA 823 – B- 04-011, 2001.
- ESCARRONE, A. L. V.; CALDAS, S.S.; FURLONG, E. B.; MENEGHETTI, V. L.; FAGUNDES, C. A. A.; ARIAS, J. L. O.; PRIMEL, E. G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 597-602, 2014.

EVANS, W. C. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. **Nature**, v. 270, p. 17-22, 1977.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **GRAS Notification for *Spirulina* microalgae**. [S.l]: 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM265861>. Acesso em: 08 de ago. 2015, 10:12:00.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 577-596, 1997.

HOLLIGER, C.; GASPARD, S.; GLOD, G.; HEIJMAN, C.; SCHUMACHER, W.; SCHWARZENBACH, R. P.; VAZQUEZ, F. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, v. 20, p.517-523, 1997.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2059-2067, 2000.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R.; Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 8ª Ed. New Jersey, Prentice-Hall., 606-768, 1997.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Synthesis of enhanced biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by foam fractionation. **Journal of surfactants and Detergents**, v. 4, p. 355-357, 2001.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural water: sources, occurrence and analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 417-428, 1999.

MARTINS, V. G. **Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MOREIRA, M. S. F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, 626p. 2002.

NEUSELY, S. JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, V. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª Ed. Livraria Varela, São Paulo, 2010.

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.58, p.254-260, 2006.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

RADMANN, E. M.; MORAIS, E. G.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Microalgae cultivation for biosurfactant production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 2283-2289, 2015.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of general microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and *outdoor* mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2009.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109-116, 2006.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. Ed. Edgard Blücher, 1973.

SZUHAJ, B. F. Lecithins sources, manufacture e uses. **American Oil Chemists Society**, p. 74-76, 1989.

THOMAS, G. **Química medicinal – uma introdução**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

TRACY, J. W.; VANDE-VAA, E. A. **Xenobiotic metabolism**. In: Biochemistry and molecular biology of parasites. Academic Press. New York, 1995.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 77, p. 9–13, 2002.

ZILIO, R. L.; HOLZ, J. C. P.; GOULARTE, P. G.; RADMANN, E. M.; TREICHEL, H.; COSTA, J. A. V. Bioremediation of a sand soil contaminated by simulated spill of benzene, toluene and xylene. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 39-47, 2012.



## **CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL**



### 3. CONCLUSÃO GERAL

As bactérias estudadas (*Bacillus subtilis* CCT 7678 e *Corynebacterium aquaticum*) apresentaram redução da tensão superficial e atividade emulsificante, dentro dos critérios de biossurfactantes, sendo os melhores resultados observados para *Corynebacterium aquaticum* com redução da tensão superficial para  $30,4 \text{ mN m}^{-1}$ , em relação a água ( $72 \text{ mN m}^{-1}$ ) e atividade emulsificante de 99,7 % de água em óleo. Tanto no solo contaminado com petróleo, como no solo contaminado com óleo combustível, as maiores taxas de degradação de HAP 97,3 e 93,5 %, respectivamente, foram obtidos com os biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum*.

As microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117 apresentaram os melhores resultados de redução da tensão superficial ( $25,3$  e  $28,3 \text{ mN m}^{-1}$ , respectivamente) e atividade emulsificante (78,6 e 97,0 %, respectivamente). Em solo contaminado com petróleo, a maior taxa de biodegradação foi observada com biossurfactantes de *Scenedesmus obliquus* LEB 117 (93,1 %), porém, no solo contaminado com óleo combustível, a maior taxa de biodegradação foi obtida com biossurfactantes extraídos de *Chlorella fusca* LEB 111 (87,8%)

Dentre os HAP avaliados, naftaleno, acenafteno e fluoreno, foram os compostos que biodegradaram mais rapidamente em todos os ensaios, mantendo-se principalmente o criseno durante os 90 d de biorremediação, tanto com biossurfactantes das bactérias, como com os biossurfactantes das microalgas. Em relação a degradação com o uso dos biossurfactantes obtidos de *Bacillus subtilis* CCT 7678 e de *Corynebacterium aquaticum*, naftaleno foi degradado em até 6 dias, acenafteno e fluoreno em até 30 d de biorremediação. Em relação a degradação utilizando os biossurfactantes extraídos das microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117, o naftaleno foi degradado em até 15 d e acenafteno e fluoreno, em até 45 d de biorremediação.

Neste estudo foi observado que ambas as bactérias e microalgas apresentaram resultados satisfatórios na redução da tensão superficial e atividade emulsificante, além da elevada taxa de degradação de HAP, superior a 80 %, com o uso dos biossurfactantes produzidos por esses micro-organismos.



#### 4. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Identificar a biota nativa do solo que será biorremediado;
- Identificar os tipos de biossurfactantes produzidos pelas bactérias *Bacillus subtilis* CCT 7678 e *Corynebacterium aquaticum* e pelas microalgas *Chlorella fusca* LEB 111 e *Scenedesmus obliquus* LEB 117;
- Estudar a influência do nitrogênio no cultivo de microalgas, para a produção de biossurfactantes;
- Estudar o processo de purificação dos biossurfactantes produzidos pelas bactérias e microalgas;
- Estudar os parâmetros (umidade, temperatura e pH) na biorremediação de solos contaminados com HAP;
- Estudar a biorremediação do criseno por mais de 90 dias, utilizando os biossurfactantes deste estudo.



## **CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 305-325, 2008.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143-151, 2008.

ABU-RUWAIDA A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; KHAMIS, A. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus bacterium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 53-6, 1991.

ACEVEDO, T. G.; MCINERNEY, M. J. Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 1-7, 1996.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 313-316, 2000.

AHTIAINEN, J.; JARVINEN, R. V. M.; JOUTTI, A. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosotecontaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p.323-329, 2002.

AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171-179, 2006.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed. New York, John Wiley, p.423-437, 1977.

ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

AL-SULAIMANI, H.; JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BAHRY, S. N.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, p. 147-158, 2011.

AL-WAHAIBI, Y. M.; JOSHI, S. J.; AL-BAHRY, S. N.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2014.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402-3410, 2011.

AMÉZCUA-VEGA, C. A.; VARALDO, P. H. M.; GARCÍA, F.; LEAL E. R.; VÁZQUEZ, R. R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 237-240, 2007.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, p. 17-43, 2010.

AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists international**. 17. ed. Washington: D. C., 2000.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipidsurfactant produced by *B. subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 488-494, 1968.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. **Advances in Microbial Ecology**, v.12, p. 287-338, 1992.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-213, 1999.

AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 63, p. 169-213, 1999.

BACHMANN, R. T.; JOHNSON, A. C.; EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 86, p. 225-237, 2014.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p.723-736, 2005.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum-contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PBASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 15-18, 2004.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 growing on soap stock as the carbon source. **Journal of Food Engineering Essex**, 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.

BERRIE, J. W.; WILLIAMS, R. A. D.; SMITH, K. E. Microbial transformations of steroids – XII. Progesterone hydroxylation profiles are modulated by translational modification of an electron transfer protein in *Streptomyces roseochromogenes*. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 77, p. 87-96, 2001.

BERRY, D. F.; FRANCIS, A. J.; BOLLAG, J. M. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 43-59, 1987.

BERTRAND J. C.; ALMALLAH, M.; ACQUARIVA, M.; MILLE, G. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. **Letters Applied Microbiology**, v. 11, p. 260-263, 1990.

BICCA, C.F.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 231–236, 1999.

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, p. 497–503, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W.T. A method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 77, p. 911–917, 1959.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BOROWITZKA, M. A. Algal growth media and sources of culture. In: BOROWITZKA, M. A. e BOROWITZKA, L. J., eds, **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 456-465, 1988.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Tecnologia das Fermentações**. Vol. 1, São Paulo-SP, Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

BRANDLI, R.; KUPPER, T.; BUCHELI, T.; MAYER, J.; STADELMANN, F. X.; TARRADELLAS, J. **Occurrence and relevance of organic pollutants in compost, digestate and organic residues**. Literature review. EPF Lausanne – ENAC – ISTE – CECOTOX/Agroscope FAL Reckenholz, 2004.

BRASIL. **Lista de Novos Ingredientes Aprovados**. [S.l]: 2005. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_ingredientes.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm). Acesso em: 26 de jan. 2016

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, p. 1572-1577, 2010.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

- CAMERINI, F. V.; CHANIN, C. **Produção de biossurfactantes fúngico por fermentação em estado sólido**. 2005. Trabalho de Conclusão (Curso em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- CARVALHO, L. F. **Produção de biossurfactantes e nanoemulsões a partir da microalga *Spirulina***. 2014. 113f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, J. A. V. Evaluation of the influence of nitrogen and phosphorus nutrients in the culture and production of biosurfactants by microalga *Spirulina*. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, p. 90-98, 2014.
- CASTIGLIONI, G. L. **Modelagem e simulação da produção de biossurfactante e lipase por fermentação em estado sólido**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v. 30, p. 31-71, 1984.
- CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T.; BALAN, C. V. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. **Journal of General Microbiology**, v. 116, p. 495-500, 1980.
- CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.324–333, 1997.
- CERQUEIRA, V. S. **Produção de biossurfactantes e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- CEVC, G. **Phospholipids – Handbook**. Marcel Dekker, Inc. New York, EUA. 1993.
- CHAILLAN, F.; FLECHA, A. L.; BURY, E.; PHANTAVONG, E. B.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobichydrocarbon degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 55, p. 587-595, 2004.
- CHAÎNEAU, C. H.; ROUGEUX, G.; YÉPRÉMIAN, C.; OUDOT, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 37, p. 1490–1497, 2005.
- CHAMKHA, M., MNIF, S. AND SAYADI, S. Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high temperature oil field. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, p. 23-29, 2008.
- CHAUTON, M. S.; STORSETH, T. R.; KRANE, J. Analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), and comparison with analysis of lipophilic extracts. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 611-618, 2004.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 71-81, 2011.

CHINI-ZITTELLI, G.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. **Aquaculture**, v. 261, p. 932-943, 2006.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461-465, 2004.

CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSERT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbons biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, v. 351, p. 640-642, 1991.

CLEMENT, T. P.; PEYTON, B. M.; SKEEN, R. S. et al. Microbial growth and transport in porous media under denitrification conditions: experiments and simulations. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 24, p. 269-285, 1997.

COATES, J. D.; WOODWARD, J.; ALLEN, J.; PHILP, P.; LOVLEY, D. R. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3589-3593, 1997.

COMANA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO Nº 420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 2009. p. 81-84.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

CORSEUIL, H. X. Influência do receptor de elétrons na biorremediação de águas subterrâneas contaminadas por derramamentos de gasolina. **VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol. 1, p.68-75, 1994.

COSTA, E. **Produção e avaliação das propriedades de biossurfactantes produzido em fermentação fúngica em estado sólido**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

COSTA, J. A. V. **Produção de amiloglicosidase por fermentação em estado sólido em biorreator de coluna**. 1996. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; ARRIECHE, L.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, in press, 2006.

CROSMAN, J. T.; PINCHUK, R. J.; COOPER, D. G. Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 467-472, 2002.

CUBITO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; CHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SIÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, v. 15, p. 281-287, 2004.

CUSTANCE, S. R.; MCCAWE, P. A.; KOPF, A. C.; SULLIVAN, M.J. Environmental fate of the chemical mixtures: crude oil, jp-5, mineral spirits, and diesel fuel. **Journal of Soil Contamination**, v. 1, p. 379-386, 1992.

DAMAS, A.; ANTUNES, C.; SILVA, N.; ALVES, S. **As marés negras e os seus efeitos tóxicos na fauna marinha**. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 2000.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., Ed.; Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3.

DROR, I.; GERSTL, Z.; YARON, B. Temporal changes in kerosene content and composition in field soil as a result of leaching. **Journal of Contamination Hydrology**, v.48, p.305- 323, 2001.

DROUIN, C. M.; COOPER, D. G. Biosurfactant and aqueous two phase fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p. 86–90, 1992.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. A Citizen's guide to chemical oxidation. EPA 542-F-01-013, 2001.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers. chapter IV – Biopiles, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04- 002, p. 30, 2004.

ESCARRONE, A. L. V.; CALDAS, S.S.; FURLONG, E. B.; MENEGHETTI, V. L.; FAGUNDES, C. A. A.; ARIAS, J. L. O.; PRIMEL, E. G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. **Food Chemistry**, v. 146, p. 597-602, 2014.

EVANS, W. C. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. **Nature**, v. 270, p. 17-22, 1977.

FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em: [http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E08.htm#Gross nutrient composition](http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E08.htm#Gross%20nutrient%20composition). Acesso em 14 nov. 2016.

FERRAREZZO, E. M. **Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão**. 1998. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; TAVARES, I. M. C.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. **Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, p. 207-213, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **GRAS Notification for *Spirulina* microalgae**. [S.l]: 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM265861>. Acesso em: 08 de ago. 2015, 10:12:00.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S. et al. Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 39-45, 2003.

GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A. P.; MIRANDA, A.; SOUSA, I.; EMPIS, J. Colouring emulsions using microbial biomass – stability over time. In L. Dufosse´ (Ed.), **Pigments in food – more than colours** (p. 121–123). Quimper: Pigments Publishing, Universite de Bretagne Occidentale, 2004.

GRIMA, E.M.; SEVILLA, J.M.F.; PEREZ, J.A.S.; CAMACHO, F.G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 59–69, 1996.

GRIS, B.; MOROSINOTTO, T.; GIACOMETTI, G. M.; BERTUCCO, A.; SFORZA, E. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: Effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2377-2389, 2014.

GUARINO, C.; SPADA, V.; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation e Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Chemosphere**, v. 170, p. 10-16, 2017.

HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 63-70, 1999.

HARVEY, S.; ELASHVILI, I.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, A. M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. **Biotechnology**, v.8, p. 228-230, 1990.

HASAN, S. D. M.; COSTA, J. A. V.; SANZO, A. V. L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 787-791, 1998.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 577-596, 1997.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.

HOLLIGER, C.; GASPARD, S.; GLOD, G.; HEIJMAN, C.; SCHUMACHER, W.; SCHWARZENBACH, R. P.; VAZQUEZ, F. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, v. 20, p.517-523, 1997.

HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RILKE, O.; KLEBER, H. P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 147-155, 1994.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R. J. S.; SANTOS, E. C.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S.; CAMARGO, F. A. O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.56, p.150-156, 2005.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; XU, X.; LIAO, Y.; SHOU, L.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZENG, J. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. **Acta Ecologica Sinica**, v. 30, p. 8-15, 2010.

JIMENEZ, C.; COSSIO, B.R.; LABELLA, D.; NIELL, F.X. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, p. 179–190, 2003.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v.133, p.71- 84, 2005.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2059-2067, 2000.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. **Algal Nutrition**. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boston: CRCPress, 1990.

KARHU, M.; KAAKINEN, J.; KUOKKANEN T.; RÄMÖ J. Biodegradation of light fuel oils in water and soil as determined by the manometric respirometric method. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 197, p. 3-14, 2009.

- KIM, H. S.; JEON, J. W.; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H.; YOON, B. D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 391-396, 2006.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.
- KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371–380, 2010.
- LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456-469, 2012.
- LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion I Colloid e Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R.; Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª. Ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LEVISAUSKAS, D.; GALBAUSKAS, V.; ZUNDA, G. et al. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azobacter vinelandii*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1141-1146, 2004.
- LI, C.; CHENG, C.; CHEN, T. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 25-31, 2004.
- LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, E.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 31-37, 2015.
- MACLEOD, C.T.; DAUGULIS, A.J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. **Process Biochemistry**, v.40, p.1799–1805, 2005.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**.8ª Ed. New Jersey, Prentice-Hall., 606-768, 1997.
- MAGNET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v. 74, p. 1047-1051, 1992.
- MAHADIK, N. D.; BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology**, v. 52. USA: Academic Press, Cap. 4, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Synthesis of enhanced biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by foam fractionation. **Journal of surfactants and Detergents**, v. 4, p. 355-357, 2001.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 5, p. 1-19, 2011.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural water: sources, occurrence and analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 417-428, 1999.

MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 533-535, 2012.

MARTINS, R. G.; PINTO, M. H.; SILVA, M. A.; COSTA, J. A. V. **Biosurfactante bacteriano e fúngico: produção através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**. Artigo publicado no XXII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia. Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo-RS, 2007b.

MARTINS, R. G.; PINTO, M. H.; SILVA, M. A.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. **Influência do teor de umidade e estudo da condição de extração na produção de biosurfactante pela bactéria *Corynebacterium aquaticum* em processo fermentativo em estado sólido**. Resumo publicado no XIX Salão de Iniciação Científica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2007a.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARTINS, V. G. **Produção de biosurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MARTINS, V. G.; KHALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. In situ bioremediation using biosurfactant produced by solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 843–851, 2009.

MASOJIDEK, J.; TORZILLO, G. **Mass cultivation of fresh water microalgae**. In: Encyclopedia of ecology, Oxford, UK, pp. 2226–2235, 2008.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217–232, 2010.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiological Research**, v. 155, p. 249–256, 2001.

MAUREL, V. B.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 881–896, 2003.

MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M.; CHISHOLM, J. L. et al. Use of indigenous or injected microorganisms for enhanced oil recovery. **Microbial Biosystems: New Frontiers**. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Canadá, 1999.

MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of c-linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**, v. 99, p. 57–63, 2006.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M. N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 822–832, 2001.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211–1225, 2000.

MNIF, S., CHAMKHA, M. AND SAYADI, S. Isolation and characterization of a *Halomonas* sp. strain C2SS100 a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline condition. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 785–794, 2009.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 111, p. 525–536, 2011.

MOHANTY, P.; SRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K. B. **The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer**. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. 245f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

- MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 4116-4132, 2015.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO<sub>2</sub> from synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 66, p. 313-318, 2011.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.
- MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M. ESTEVES, J. L.; SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Biodegradation**, v. 11, p. 65-71. 2000.
- MOREIRA, M. S. F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, 626p. 2002.
- MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; , IMURA, T.; YAMAMOTO, S.; , KITAGAWA, M.; SOGABE, A.; KITAMOTO, D. Production of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylmannitol lipid, by *Pseudozyma parantarctica* and its interfacial properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 1017-1025, 2009.
- MULLIGAN, C. N. Environment applications for biosurfactants. **Environment Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 47, p. 23-29, 1990.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. Natural attenuation of contaminated soil. **Environmental International**, v. 30, p.587-601, 2004.
- MUTNURI, S.; VASUDEVAN, N.; KAESTNER, M. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.569-576, 2005.
- NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. P. Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-oil petroleum oil emulsions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 435–440, 2002.
- NEUSELY, S. JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, V. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª Ed. Livraria Varela, São Paulo, 2010.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- OLIVEIRA, V. B.; TÓTOLA, M. R.; NASCIMENTO, A. G.; BORGES, A. C.; KASUY, M. C. M. Bactérias para aplicação em recuperação avançada de petróleo. **Acta Tecnológica**, v. 9, p. 48-57, 2014.

- PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.58, p.254–260, 2006.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant; effects on respiratory activity and growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 91-101, 1979.
- PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1997.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: Um alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico online**, v. 102, p. 1-5, 2005.
- PINTO, M. H. **Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2009.
- POERSCHMANN, J.; SPIJKERMAN, E.; LANGER, U. Fatty acid patterns in *Clamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and tzmpearture under extremely acidic conditions. **Microbial Ecology**, v. 48, p. 78–89, 2004.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 172-179, 2008.
- PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F. EPAs Alaska oil spill bioremediation project. **Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 372–379, 1991.
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 671– 674, 1997.
- RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RADMANN, E. M.; MORAIS, E. G.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Microalgae cultivation for biosurfactant production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 2283-2289, 2015.
- RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. **Journal of Basic Microbiology**, v. 4, p. 284-291, 2002.
- RATLEDGE, C. **Biochemistry of microbial degradation**. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 1994.
- RAYMUNDO, A.; GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; EMPIS, J.; SOUSA, I. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. **Food Research International**, v. 38, p. 961-965, 2005.
- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos**. Vol. 1, Pelotas - RS, Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 1996.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of general microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- RODOLFI, L.; CHINI ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and *outdoor* mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 100-112, 2009.
- RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus strains*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109-116, 2006.
- ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R. H.; DUFOUR, S. E.; VEENING, H.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F. M.; KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCIA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 430-440, 2007.
- ROSA, A. P.; TRIGUIS, J. A. Bioremediation process on Brazil shoreline. **Environmental Science Pollution Resource International**, v. 17, p. 470-476, 2007.
- SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Incorporation of death kinetics into a 2D dynamic heat transfer model for solid state fermentation, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 64, p. 253-260, 1995.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT AND, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 127-144, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. et al. **Biotechnologia Industrial**. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, v. 2, 2001.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifer from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.

SHTRIPLING, L. O.; KHOLKIN, E. G.; LARIONOV, K. S. The technology refinement of soil decontamination contaminated with petroleum products by the reagent capsulation method. **Procedia Engineering**, v. 152, p. 13-17, 2016.

SHU, C.; XU, C.; LIN, G. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, in press, 2006.

SILVA, R. D. C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523– 12542, 2014.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos – Campinas**, v. 27, p. 805-811, 2007.

SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; DESAI, J. D. Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 743-746, 1990.

SINGH, R. N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2347-2353, 2012

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Edited by: TIMMIS, K.N. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 3689-3704, 2010.

SOUDMAND-ASLI, A.; AYATOLLAHI, S. S.; MOHABATKAR, H.; ZAREIE, M.; SHARIATPANAHI, S. F. The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 58, p. 161-172, 2007.

SOUZA, K. C.; TANABE, A. K. R.; SABONARO, D. Z.; SMITH, W. S. Biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos utilizando fungos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, p. 43-52, 2016.

STARK, J. S.; SNAPE, I.; RIDDLE, M. J. The effects of petroleum hydrocarbon and heavy metal contamination of marine sediments on recruitment of Antarctic soft-sediment assemblages: a field experimental investigation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 283, p. 21-50, 2003.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v.56, p. 845-857, 2005.

SUGUIO, K. **Introdução à sedimentologia**. Ed. Edgard Blücher, 1973.

SUTHERLAND, D. L.; HOWARD-WILLIAMS, C.; TURNBULL, M. H.; BROADY, P. A.; CRAGGS, R. J. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 222-229, 2015.

SYLDATK, C.; WAGNER, F.; **Biosurfactants and Biotechnology**, Marcel Dekker: New York, cap. 3.1987.

SZUHAI, B. F. Lecithins sources, manufacture e uses. **American Oil Chemists Society**, p. 74-76, 1989.

TAM, E. K. L.; BYER, P. H. Remediation of contaminated lands: a decision methodology for site owners. **Journal of Environmental Management**, v. 64, p. 387-400, 2002.

TAMIYA, H.; SHIBATA, K.; SASA, T.; IWAMURA, T.; MORIMURA, Y. **Effect of diurnally intermittent illumination of the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*, in algal culture**. From Laboratory to Pilot Plant, Publ. n 600, BURLEW, J. S., ed. The Carnegie Institution, Washington D.C., 1953. In: RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. In Progress in Phycological Research. Round & Chapman (Eds). Biopress Ltd. 7, p. 61, 1990.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAIPONG, T.; CHOTELERSAK, K.; ARUNRATTIYAKORN, P.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 588-592, 2004.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 686-691, 2007.

THOMAS, G. **Química medicinal – uma introdução**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 1025-1035, 2010.

TORRES, L.; MOCTEZUMA, A.; AVENDAÑO, J. R.; MUÑOZ, A.; GRACIDA, J. Comparison of bio- and synthetic surfactants for EOR. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 76, p. 6-11, 2011.

TRACY, J. W.; VANDE-VAA, E. A. **Xenobiotic metabolism**. In: Biochemistry and molecular biology of parasites. Academic Press. New York, 1995.

TREDICI, M. R. Photobioreactors: designs and strategies to achieve 10% solar energy conversion efficiency through microalgae cultivation. **Aqua 2006**, Florence, Italy, 9-13 May 2006.

TREDICI, M. R.; RODOLFI, L. Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organisms. *Patent* WO 2004/074423 A2 (to Università degli Studi di Firenze), 2004.

TREVAN, M. D. T.; BOFFEY S.; GOULDING K. H.; STANBURYK, P. **Biotecnologia: Princípios biológicos**. Editora Acribia, S.A.; Zaragoza – Espanha, 284p.; 1990.

TSUGE, K.; INOUE, S.; ANO, T.; ITAYA, M.; SHODA, M. Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, 2005.

VANCE-HARROP, M. H. V.; GUSMÃO, N. B.; TAKAKI, G. M. C. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using d-glucose and babassu oil as carbon sources **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123, 2003.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

VEENANADIG, N. K.; GOLTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

VOLPON, L.; BESSON, F.; LANCELIN, J.. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. **FEBS Letters**, v. 485, p. 76-80, 2000.

WANG, B.; LAN, C.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 904-912, 2012.

WEBER, L.; DOGE, C.; HAUFE, G.; HOMMEL, R.; KLEBER, H. P. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. **Biocatalysis**, v. 5, p. 267-272, 1992.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANGY, J.; KUNG, S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 174-178, 2003.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 4, p. 273-294, 2003.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 77, p. 9-13, 2002.

YAKIMOV, M. M.; AMRO, M. M.; BOCK, M.; BOSEKER, K.; FREDRICKSON, H. L.; KESSEL, D. G.; TIMMIS, K. N. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 18, p. 147-160, 1997.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1329-1334, 2005.

YUE, D.; YOU, F.; SNYDER, S. W. Biomass-to-bioenergy and biofuel supply chain optimization: Overview, key issues and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, v. 66, p. 36-56, 2014.

ZHANG, X.; YOUNG, L. Y. Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4759-4764, 1997.

ZHOU, Z. et al. Characterization of oil components from Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico using fluorescence EEM and PARAFAC techniques. **Marine Chemistry**, v. 148, p. 10-21, 2013.

ZILIO, R. L. **Biorremediação de solos contaminados a partir de biossurfactantes obtidos de resíduos agroindustriais**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

ZILIO, R. L.; FURLONG, V. B.; OLIVEIRA, M. S.; RADMANN, E. M.; SANTOS, T. D.; TREICHEL, H.; COSTA, J. A. V. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon and total petroleum hydrocarbons using biosurfactants and chemical dispersant. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 6, p. 162-168, 2016.

ZILIO, R. L.; HOLZ, J. C. P.; GOULARTE, P. G.; RADMANN, E. M.; TREICHEL, H.; COSTA, J. A. V. Bioremediation of a sand soil contaminated by simulated spill of benzene, toluene and xylene. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 39-47, 2012.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 67-73, 2002.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1 – CONCENTRAÇÃO DE HAP

**Tabela 2** - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de *Bacillus subtilis* CCT 7678

HAP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	EXP. PETRÓLEO								EXP. ÓLEO COMBUSTÍVEL							
	Tempo (dias)															
	0	3	6	15	30	45	60	90	0	3	6	15	30	45	60	90
Naftaleno	355	5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	420	6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Acenaftileno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Acenafteno	111	55	28	11	n.d	n.d	n.d	n.d	127	29	7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fluoreno	100	53	34	19	n.d	n.d	n.d	n.d	144	28	16	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fenantreno	517	285	309	160	11	n.d	<LOQ	<LOQ	981	408	143	14	4	n.d	<LOQ	n.d
Antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	45	20	n.d	16	n.d	n.d	n.d	n.d
Fluoranteno	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	42	n.d	55	28	n.d	n.d	n.d	n.d
Pireno	<LOQ	n.d	41	<LOQ	54	<LOQ	<LOQ	<LOQ	162	247	274	262	225	161	124	127
Benzo(a)- antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	32	n.d	n.d	n.d	n.d	18	14	n.d
Criseno	56	61	82	76	102	78	41	45	187	196	197	198	133	142	140	104

<LOQ = Menor que limite de quantificação do método.

n.d = Não detectado.

**Tabela 3** - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de *Corynebacterium aquaticum*

HAP ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	EXP. PETRÓLEO								EXP. ÓLEO COMBUSTÍVEL							
	Tempo (dias)								Tempo (dias)							
	0	3	6	15	30	45	60	90	0	3	6	15	30	45	60	90
Naftaleno	184	14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	435	<LOQ						
Acenaftileno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Acenafteno	90	82	58	19	n.d	n.d	5	n.d	128	32	50	17	n.d	n.d	n.d	n.d
Fluoreno	109	95	56	34	n.d	n.d	n.d	n.d	174	73	57	16	n.d	n.d	n.d	n.d
Fenantreno	511	566	426	243	35	n.d	<LOQ	<LOQ	987	778	678	310	8	n.d	2	9
Antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	42	30	27	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fluoranteno	5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	30	27	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	8
Pireno	23	4	21	44	<LOQ	n.d	5	n.d	137	175	243	258	211	133	118	56
Benzo(a)- antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	35	24	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Criseno	68	89	76	73	79	59	36	27	178	188	153	167	104	113	100	67

<LOQ = Menor que limite de quantificação do método.

n.d = Não detectado.

**Tabela 4** - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de *Chlorella fusca* LEB 111

HAPs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	EXP. PETRÓLEO								EXP. ÓLEO COMBUSTÍVEL							
	Tempo (dias)								Tempo (dias)							
	0	3	6	15	30	45	60	90	0	3	15	30	45	60	90	
Naftaleno	43	<LOQ	68	18	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ							
Acenaftileno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Acenafteno	105	68	59	32	8	n.d	7	n.d	112	96	31	11	n.d	n.d	n.d	
Fluoreno	110	84	62	47	18	n.d	n.d	n.d	142	121	51	19	n.d	n.d	n.d	
Fenantreno	537	534	486	398	223	57	13	7	908	939	710	230	11	5	7	
Antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	40	43	35	n.d	n.d	n.d	n.d	
Fluoranteno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	29	33	n.d	43	n.d	20	7	
Pireno	n.d	17	<LOQ	<LOQ	16	n.d	<LOQ	<LOQ	140	201	296	182	259	150	93	
Benzo(a)- antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	37	44	n.d	29	n.d	13	n.d	
Criseno	68	88	81	78	61	74	65	83	173	193	173	169	127	153	94	

<LOQ = Menor que limite de quantificação do método.

n.d = Não detectado.

**Tabela 5** - Concentração de HAP durante o processo de biorremediação de solos contaminados com petróleo e óleo combustível, utilizando biossurfactantes de *Scenedesmus obliquus* LEB 117

HAPs ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	EXP. PETRÓLEO								EXP. ÓLEO COMBUSTÍVEL							
	Tempo (dias)															
	0	3	6	15	30	45	60	90	0	3	15	30	45	60	90	
Naftaleno	60	8	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	87	21	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Acenaftileno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Acenafteno	103	74	38	18	10	n.d	<LOQ	n.d	120	75	21	15	n.d	n.d	n.d	
Fluoreno	91	56	46	36	19	n.d	n.d	n.d	158	86	34	18	n.d	n.d	n.d	
Fenantreno	543	439	415	308	148	26	8	n.d	937	847	539	216	17	24	11	
Antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d	n.d	n.d	54	31	24	n.d	n.d	n.d	n.d	
Fluoranteno	14	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	33	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d	
Pireno	n.d	5	10	<LOQ	45	3	<LOQ	<LOQ	138	217	189	267	135	201	138	
Benzo(a)- antraceno	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	32	n.d	37	n.d	21	15	n.d	
Criseno	68	66	77	70	100	70	54	61	179	164	163	128	139	147	109	

<LOQ = Menor que limite de quantificação do método.

n.d = Não detectado.

## APÊNDICE 2 – CARACTERIZAÇÕES FÍSICAS DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO

Tabela 6 - Valores de pH durante a biorremediação

Micro-organismos	EXP. PETRÓLEO							EXP. ÓLEO COMBUSTÍVEL						
	Tempo (dias)													
	0	3	15	29	43	59	90	0	3	15	29	43	59	90
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7678	5,31	5,31	5,17	4,93	5,17	5,41	5,5	5,12	5,10	4,97	5,16	5,33	5,45	5,55
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	5,40	5,53	5,07	5,54	5,08	5,08	5,60	5,56	5,56	5,21	5,32	5,42	5,42	5,65
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	5,4	5,36	5,32	5,22	5,31	5,49	5,58	5,45	5,43	5,14	5,0	5,45	5,54	5,60
<i>Scedesmus obliquos</i> LEB 117	5,30	5,28	5,11	5,23	5,29	5,32	5,35	4,80	4,70	5,13	5,18	5,16	4,56	5,20
Biota nativa (branco)	5,11	5,10	4,91	5,12	5,22	5,22	5,30	5,11	5,10	4,91	5,12	5,22	5,22	5,30

**Tabela 7** - Valores de temperatura durante a biorremediação

<b>Dia</b>	<b>Temperatura mínima °C</b>	<b>Temperatura máxima °C</b>	<b>Temperatura solo °C</b>
1	18	26	26
2	20	24	22
3	21	25	23
6	21	26	21
7	18	20	22
8	20	20	21
9	18	23	22
10	16	22	18
13	10	24	22
14	17	21	20
15	18	21	19
16	18	22	21
17	18	20	21
20	14	25	20
21	15	25	20
22	15	24	21
23	18	21	20
24	22	29	29
27	15	28	20
28	15	22	21
29	19	20	20
30	18	28	23
31	17	30	22
34	22	33	25
35	19	21	24
38	17	27	22
40	17	26	23
53	23	30	25
54	20	27	23
55	20	27	22

---

56	20	25	23
57	20	25	21
60	25	27	26
61	20	28	25
62	26	34	27
63	20	26	22
64	20	30	22
67	26	33	25
68	23	35	22
69	22	27	25
70	26	27	27
71	26	30	25
75	20	30	22
76	20	30	21
77	22	27	21
78	18	26	25
83	24	31	25
84	20	25	22
85	18	25	22
88	24	27	26

---

## APÊNDICE 3 – LAUDOS TÉCNICOS

Figura 8 - Laudo técnico do petróleo

Refinaria de Petróleo Ipiranga S. A. Depto. Controle de Qualidade e M. A.					
<b>CERTIFICADO DE ANÁLISE DO PRODUTO</b>					
Produto: <b>PETRÓLEO</b>		Navio tanque: <b>MT Dan Eagle</b>			
Nome: <b>Petróleo Uruguá Tambau</b>		Laudo N.º: <b>8</b>		Data: <b>16/08/2015</b>	
		Carregamento: <b>1580</b>			
ENSAIOS		MÉTODOS REFERÊNCIA		RESULTADOS	
Densidade à 20/4°C		ASTM D1298		0,8595	
API		ASTM D1298		32,58	
Viscosidade à 37,8 °C, (ssu)		MB-326		49,95/7,36	
Nitrogênio Básico, (ppm)				455,91	
Salinidade, (ppm)				183,4	
Resíduo de Carbono Conradson, (%)		ASTM D189		1,04	
Enxofre, (ppm)		ASTM D5354		1250,00	
Água e Sedimento, (%)		ASTM D4007		0,20	
TAN, (mgKOH/g)		ASTM D664		C <sub>1</sub> / e	
Ponto Fluidez, (°C)		ASTM D97		3	
Pressão Vapor, (Psi)		ASTM D5482		1,9	
Ferro, (ppm)		ASTM D-5185/O5			
Vanádio, (ppm)		ASTM D-5185/O6			
Cobre, (ppm)		ASTM D-5185/O7			
Níquel, (ppm)		ASTM D-5185/O8			
Sódio, (ppm)		ASTM D-5185/O9			
Benzeno (% vol)		ASTM D-1319			
Tolueno (% vol)		ASTM D-1320			
P. Inicial, °C	63				
30° C		120° C	5,0	210° C	17,0
40° C		130° C	6,0	220° C	19,0
50° C		140° C	8,0	230° C	20,0
60° C		150° C	9,0	240° C	22,0
70° C	2,0	160° C	11,0	250° C	24,0
80° C	<3,0	170° C	12,0	260° C	27,0
90° C	3,0	180° C	14,0	270° C	30,0
100° C	4,0	190° C	15,0	280° C	33,0
110° C	<5,0	200° C	16,0	290° C	36,0
				300° C	39,0
					310° C 41,0
					320° C 44,0
					330° C 47,0
					340° C 51,0
					350° C 54,0
					360° C 59,0
					370° C
					380° C
					390° C
					Cracking, °C 398,0
Jorge Luiz N. Reichow Eng.º Químico CRQ 5ª Região - 05301750					

Figura 9 - Laudo técnico do óleo combustível

Refinaria de Petróleo Riograndense S. A. Depto. Controle de Qualidade.			
<b>CERTIFICADO DE ENSAIO DO PRODUTO</b>			
Produto:	O. Combustível A1	Lote: 94	Data: 15/09/2015
Origem:	TQ 52	Certificado: 94	
ENSAIOS	MÉTODOS REFERÊNCIA	RESULTADO	ESPECIFICAÇÃO (PAMP 83/1999)
Densidade à 20/4°C	ASTM D1298	0,9605	
Água p/ Destilação, (%)	ASTM D95	Zero	(1)
Sedimentos por Extração, (%)	ASTM D473	0,030	(1)
Viscosidade à 50 °C, (ssf)	ASTM D68	490	600 (máx)
Ponto de Fulgor, (°C)	ASTM D93	>110	99,0 (mín)
Ponto Fluidez Superior, (°C)	ASTM D97		21,0 (máx.)
Enxofre, (%)	ASTM D4294	0,29	2,5 (máx)
Vanádio ( mg/Kg )	Absorção Atômica	2,18	200 (máx)
Alumínio ( mg/Kg )	Absorção Atômica	2,20	
Silício ( mg/Kg )	Absorção Atômica	1,51	
<p>Observações:</p> <p>(1) A soma da água por destilação e os sedimentos por extração não pode exceder 2% em volume.</p> <p style="text-align: right;">_____ Responsável Técnico</p>			
<p>Declarações</p> <p>1 Os resultados reportados neste documento referem-se a amostra ensaiada.</p> <p>2 Este C.E. somente pode ser reproduzido na sua íntegra.</p>			

Refinaria de Petróleo Riograndense S.A

Rua Eng<sup>o</sup> Heitor Amaro Barcelos, 551  
 Cep: 96202-900 - Rio Grande - RS  
 Tel: (53) 3233.8000  
 Fax: (53) 3233.8036

## APÊNDICE 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

**Tabela 8** - Composição do meio BG-11

Reagente	g L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato férrico amoniacal	0,006
EDTA	0,001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02
Micronutrientes (A5)*	1 mL L <sup>-1</sup>

\* Micronutrientes (A5) (mg L<sup>-1</sup>): H<sup>3</sup>BO<sub>3</sub> = 2,86; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O = 1,81; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 0,222; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O = 0,390; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O = 0,079.