UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

JULIANA GUERRA DE OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DE MELAÇO, MANIPUEIRA E SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Bacillus pumilus* E SUA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO

São José do Rio Preto
2014

JULIANA GUERRA DE OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DE MELAÇO, MANIPUEIRA E SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Bacillus pumilus* E SUA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, área de concentração - Ambiental, Industrial e de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto - SP.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto
2014

Oliveira, Juliana Guerra de.
Utilização de melaço, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por bacillus pumilus e sua aplicação em biorremediação de solo / Juliana Guerra de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2014
116 f. : il., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Biossurfactantes. 3. Bacillus pumilus. 4. Biorremediação. 5. Solos – Remediação. 6. Substratos. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

JULIANA GUERRA DE OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DE MELAÇO, MANIPUEIRA E SORO DE QUEIJO COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Bacillus pumilus* E SUA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, área de concentração - Ambiental, Industrial e de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto - SP.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP - São José do Rio Preto/SP
Orientador.

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP - São José do Rio Preto/SP

Profa. Dra. Maria Benincasa Vidotti
FATEC - Jaboticabal/SP

Profa. Dra. Silvia Messias Bueno
UNILAGO - São José do Rio Preto/SP

Profa. Dra. Raquel Guttierres Gomes
UEM - Maringá/PR

São José do Rio Preto
21/fevereiro /2014

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado força todas as vezes que pensei em desistir.

À minha mãe Roseli Guerra por toda atenção e amor, ao meu tio Antônio Guerra pelo apoio e carinho, ao meu irmão Júlio Cézar Guerra pela compreensão e carinho.

Agradeço ao meu noivo Emerson Renato Nunes pelo incentivo, compreensão e amor que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz por acreditar em meu trabalho, pela atenção, pela dedicação, pelos ensinamentos e por estar sempre presente.

À UNESP – São José do Rio Preto/SP e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Agradeço a técnica de laboratório Tânia por sempre estar disposta a ajudar e sempre muito dedicada a resolver cada empecilho encontrado na pesquisa.

Ao CINVESTAV (México) pela oportunidade de pesquisa no exterior e em especial à Profa. Dra. Refugio Rodríguez Vázquez pelos ensinamentos e dedicação.

A todos os professores do curso de Pós- Graduação pelos ensinamentos necessários durante o desenvolvimento do doutorado

As minhas amigas, Catharina Calochi, Luana Faria, Gisele Bueno, Michele Coimbra pelo companheirismo, pela compreensão e pela amizade.

Em especial agradeço minha amiga Juliana Ferreira pela presença constante e amizade, pelos muitos sorrisos e apoio que foram tão importantes.

Em especial também agradeço a minha amiga Vidiany Queiroz Santos por todos os momentos que compartilhamos juntas. Muitas alegrias e muitas dificuldades que superamos juntas. Obrigada por todo o carinho, compreensão e apoio. Que bom é sua vida em minha vida.

A CAPES pela bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... ix
LISTA DE TABELAS..... xv
RESUMO..... 1
ABSTRACT..... 2
1. INTRODUÇÃO..... 3
2. OBJETIVOS..... 4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 5
3.1 SURFACTANTES..... 5
3.2 BIOSSURFACTANTES..... 8
3.2.1 Aplicações dos biossurfactantes..... 12
3.2.1.1 Biorremediação..... 12
3.2.1.2 Outras aplicações..... 15
3.2.2 Micro-organismos produtores de biossurfactantes..... 18
3.3 *Bacillus pumilus* 23
3.4 SUBSTRATOS..... 25
3.4.1 Sacarose..... 26
3.4.2 Melaço..... 27
3.4.3 Manipueira..... 28
3.4.4 Soro de queijo..... 29
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 30
4.1 MICRO-ORGANISMO..... 30
4.2 MEIOS DE CULTURA 30
4.2.1 Meio de manutenção do micro-organismo..... 30
4.2.2 Meio mínimo ou basal..... 30
4.2.3 Preparo do substrato..... 30
4.2.4 Meio de produção..... 31
4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO..... 31
4.3.1 Pré-fermentação..... 31
4.3.2 Preparo do inóculo..... 31
4.3.3 Fermentação..... 32
4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO 32

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS 33
4.5.1 Determinação do crescimento microbiano..... 33
4.5.2 Determinação da presença de biossurfactante..... 34
4.5.3 Determinação do pH final..... 34
4.5.4 Determinação da tensão superficial..... 35
4.5.5 Índice de emulsificação – tolueno/ óleo de soja..... 35
4.6 PARÂMETROS SELECIONADOS..... 35
4.6.1 Determinação da diluição micelar crítica (CMD)..... 35
4.6.2 Estudos de estabilidade..... 35
4.6.2.1 Estabilidade frente à temperatura..... 36
4.6.2.2 Estabilidade frente à força iônica..... 36
4.6.2.3 Estabilidade frente à pH..... 36
4.6.3 Concentração bruta de biossurfactante 36
4.6.4 Produção em escala ampliada 37
4.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO..... 37
4.7.1 Amostra de solo..... 38
4.7.2 Textura do solo..... 38
4.7.3 Determinação de nitrogênio total (Método kjeldalh)..... 38
4.7.4 Determinação de fósforo total..... 39
4.7.5 Determinação da matéria orgânica..... 39
4.7.6 Determinação da capacidade de campo..... 40
4.7.7 pH do solo…… 40
4.8 BIORREMEDIAÇÃO..... 40
4.8.1 Determinação do CO_2..... 41
4.8.2 Determinação dos hidrocarbonetos de fração pesada (HFP)..... 42
4.8.3 Determinação dos hidrocarbonetos de fração média (HFM)..... 42
5. RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO..... 43
5.1 CRESCIMENTO MICROBIANO..... 43
5.2 DETERMINAÇÃO DO PH FINAL..... 51
5.3 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL..... 53
5.4 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO..... 59
5.5 PARÂMETROS SELECIONADOS..... 64
5.5.1 Determinação da diluição micelar crítica (CMD)..... 65

5.5.2 Produção bruta de biossurfactante..... 66
5.5.3 Teste de estabilidade..... 67
5.5.4 Produção em escala ampliada 70
5.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO..... 73
5.7 BIORREMEDIAÇÃO..... 74
5.7.1 Redução de hidrocarbonetos de fração média e fração pesada (HFM, HFP)..... 74
5.7.2 Determinação do CO_2..... 80
6. CONCLUSÕES..... 85
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do comportamento do tensoativo entre as fases líquida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a concentração micelar crítica..... 7

Figura 2 Um soforolipídio cíclico e um acíclico..... 11

Figura 3 Surfactina produzida por *Bacillus subtilis*..... 11

Figura 4 Emulsan, biossurfactante polimérico..... 12

Figura 5 (a) Fotografia da centrífuga com tubos contendo 50 mL do caldo de fermentação; (b) fotografia da separação da célula do sobrenadante..... 34

Figura 6 Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e concentração do substrato (g/L) (equação: 1,9839E9+8,0069E7*x-4,9104E7*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 2,4312E9-3,4522E6*x-4,9104E7*y); (C) biomassa ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 1,7927E9-4,9104E7*x+2,8761E6*y)..... 45

Figura 7 Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e concentração do substrato (g/L) (equação: 8,1842E8+1,8167E7*x-1,5411E7*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e concentração do substrato (g/L) (equação: -9,75E7+1,8167E7*x+2,2533E6*y)..... 47

Figura 8 Superfícies de resposta utilizando soro de queijo como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e concentração do substrato (g/L) (equação: 2,4676E8+3,6625E7*x+2,08E6*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 7,3192E8-3,0301E6*x-1E7*y)..... 49

Figura 9 Superfícies de resposta utilizando sacarose como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 7,7304E8+1,4063E7*x-1,8028E7*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 6,0635E8-1,8028E7*x+1,3925E6*y)..... 49

Figura 10. Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 48,4606-0,1458*x+0,0243*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 47,3981+0,0243*x+0,0167*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 47,6481+0,0243*x+0,0025*y)..... 54

Figura 11 Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 30,7731+0,2083*x+0,3667*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 29,5926+0,0301*x+0,3667*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 27,6481+0,3667*x+0,025*y)..... 55

Figura 12 Superfícies de resposta utilizando soro de queijo como substrato

para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 45,5648-0,1667*x+0,1*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 44,3704+0,0116*x+0,1*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 47,1204+0,0116*x+0,0067*y)..... 57

Figura 13 Superfícies de resposta utilizando sacarose como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 4,0509-0,375*x+1,0667*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 1,8148+0,0185*x+1,0667*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 1,1759+1,0667*x+0,0117*y)..... 58

Figura 14 Emulsificação de tolueno adicionado ao caldo livre de células para a determinação do índice de emulsificação do biossurfactante produzido com melaço (a). Emulsificação de óleo de soja adicionado ao caldo livre de células para a determinação do índice de emulsificação do biossurfacante produzido com melaço (b)..... 59

Figura 15 Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 8,3025+0,1505*x-0,0028*y); (B) índice de emulsificação (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: -26,2114+1,1806*x+1,0556*y)..... 62

Figura 16 Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos

valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 27,338+2,2917*x-0,027*y); (B) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 30,5787+2,2917*x-0,1296*y)..... 62

Figura 17 Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: -33,7037+0,1852*x+1,1852*y); (B) índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 24,0741+0,1852*x-0,0889*y)..... 63

Figura 18. Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 35,2855-2,0139*x+0,0579*y); (B) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: I.E óleo = 40,841-2,0139*x-0,0556*y)..... 63

Figura 19 .Superfícies de resposta utilizando soro de queijo como substrato para o índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura e concentração do substrato (g/L) (equação: 37,6775-8,2639*x+0,1667*y)..... 64

Figura 20. Superfícies de resposta utilizando sacarose como substrato para o índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 8,2793-2,0139*x+0,3434*y)..... 64

Figura 21 Gráfico do triângulo de texturas, para denominação dos solos..... 74

Figura 22 Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de

	fração média (HFM) utilizando biossurfactante com 30% da capacidade de campo em 7 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação: 198,5894-59,2145*x-724859*y+28,7517*x*y+0).....	76
Figura 23	Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração pesada (HFP) utilizando biossurfactante com 30% da capacidade de campo em 21 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação: 80,3034-9,2023*x+41,8657*y-11,5654*x*y+0).....	76
Figura 24	Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração média (HFM) utilizando biossurfactante com 50% da capacidade de campo em 7 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação: 117,1015-15,8767*x-59,8260*y+11,71110*x*y+0).....	77
Figura 25	Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração pesada (HFP) utilizando biossurfactante com 50% da capacidade de campo em 21 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação:121,1955-15,2003*x-15,8534*y+7,9109*x*y+0).....	77
Figura 26.	Determinação de hidrocarbonetos de fração média (HFM) nos sistemas com biossurfactante na capacidade de campo de 50% após 21 dias de biorremediação.....	79
Figura 27	(a) Fotografia do cromatógrafo (Gow Mac) utilizado na determinação de CO_2; (b) fotografia dos sistemas no processo de aeração por agulhas.	81
Figura 28	Produção de CO_2 durante a remoção de hidrocarbonetos de fração média (HFM) e de hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) de um solo com 30% da capacidade de campo em diferentes tratamentos com o biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus*. (0,9-1,8 g/L de biossurfactante/% 2-4 de areia), (C=controles 2-4%	83

de areia).

Figura 29 Produção de CO_2 durante a remoção de hidrocarbonetos de fração média (HFM) e de hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) de um solo com 50% da capacidade de campo em diferentes tratamentos com o biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus*. (0,9-1,8 g/L de biossurfactante/% 2-4 de areia), (C=controles 2-4% de areia)..... 83

Figura 30 Crescimento microbiano visível no solo contendo biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus* na capacidade de campo de 50%. (a) visão em folhas de alumínio; (b) visão no microscópio óptico. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipo e origem microbiana dos biossurfactantes 20

Tabela 2 Variáveis independentes, estudadas no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, para cada substrato testado..... 32

Tabela 3 Delineamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} para os substratos: Sacarose, melaço, manipueira e soro de queijo..... 33

Tabela 4 Delineamento experimental fatorial fracionado 2^{2}..... 41

Tabela 5 Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato manipueira, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$)..... 44

Tabela 6 Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato melaço, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$)..... 46

Tabela 7 Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato soro de queijo, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$)..... 48

Tabela 8 Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato sacarose, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$)..... 50

Tabela 9 Resultados obtidos para os valores de pH final do meio de cultura utilizando os substratos: manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose na fermentação com a bactéria *Bacillus pumilus*..... 52

Tabela 10. Parâmetros escolhidos para fermentação pela bactéria *Bacillus pumilus* com os substratos, manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose..... 65

Tabela 11. Valores de tensão superficial e diluição micelar crítica (CMD) para todos os substratos testados nas melhores condições de fermentação pela bactéria *Bacillus pumilus*..... 66

Tabela 12. Efeito da temperatura (100 ºC) sobre a atividade tenso-ativa (mN/m) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos..... 68

Tabela 13 Efeito do pH sobre a atividade tenso-ativa (mN/m) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos..... 69

Tabela 14. Efeito da concentração de NaCl (%) sobre a atividade tenso-ativa (mN/m) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos..... 70

Tabela 15 Tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento microbiano determinados nos caldos livres de células obtidos durante 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação em escala ampliada utilizando sacarose como substrato na temperatura de 30 ºC, pH de 7, agitação de 200 rpm e taxa de oxigênio 10-20%..... 70

RESUMO

Os surfactantes são moléculas que por apresentarem porções hidrofílicas e hidrofóbicas são capazes de reduzir a tensão superficial de um meio contendo água. Esta característica é importante para aplicações industriais fazendo destes tenso-ativos compostos de grande interesse. Por outro lado, os biossurfactantes são moléculas que apresentam características surfactantes e são produzidas por microrganismos. Apresentam grande poder tenso-ativo e a vantagem de poderem ser produzidos a partir de substratos renováveis; além de serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade e especificidade química. O objetivo deste trabalho foi verificar a produção de um biossurfactante pela bactéria *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos. Verificar a produção e propriedades deste biossurfactante em escala ampliada (2L) utilizando sacarose como fonte de carbono, bem como, seu potencial de aplicação em biorremediação de um solo agrícola contaminado com hidrocarbonetos. Todos os experimentos foram planejados utilizando a metodologia de superfície de resposta. Para todos os experimentos de fermentação foram realizadas as análises de índice de emulsificação, tensão superficial e crescimento microbiano. Em todos os substratos testados foi determinada a concentração bruta e a estabilidade do biossurfactante produzido frente às condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Os resultados obtidos mostraram que a bactéria *Bacillus pumilus* foi capaz de crescer e produzir biossurfactante com todos os substratos testados, reduzindo a tensão superficial em até 46; 37; 47 e 32 mNm^{-1}com manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose, respectivamente. O biossurfactante foi capaz de apresentar índices de emulsificação de até 50% com tolueno e óleo de soja. A produção bruta obtida foi (g/L): 1,12; 0,35, 1,4 e 5,1 para manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose, respectivamente. O biopolímero produzido foi estável frente às variações de temperatura, pH e salinidade. Na fermentação em escala ampliada com sacarose a produção e as propriedades do biossurfactante obtido foram melhores. A produção bruta foi de 7,0 g/L, tensão superficial de até 26,3 mNm^{-1}, índice de emulsificação de 50% e CMC de 0,9 g/L. O biossurfactante aplicado em um solo contaminado com petróleo foi capaz de reduzir os hidrocarbonetos de fração média (HFM) em até 52% e os hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) em até 95,6%. A bactéria *Bacillus pumilus* foi capaz de produzir um biossurfactante com interessantes propriedades tenso-ativas e com potencial para aplicação em biorremediação de solos contaminados com petróleo.

Palavras-chave: biossurfactante, *Bacillus pumilus*, substratos alternativos; biorremediação.

ABSTRACT

Surfactants are molecules that contain hydrophilic and hydrophobic moieties, and because of this, they are capable of reducing the surface tension of a medium containing water. This feature is important for industrial applications by making these surface active compounds of high interest. On the other hand, biosurfactants are molecules that exhibit surfactant characteristics and are produced by microorganisms. They have large surface-active power and the advantage of being produced from renewable substrates; in addition to being biodegradable, have low toxicity and chemical specificity. The objective of the work was to investigate the production of a biosurfactant by *Bacillus pumilus* using cassava, molasses, cheese whey and sucrose as substrates; check the production and properties of this biosurfactant on a large scale (2L) using sucrose as carbon source, as well, as their potential for application in bioremediation of an agricultural soil contaminated by hydrocarbons. All experiments were planned using surface response methodology. For all fermentation experiments the emulsification index, surface tension, and microbial growth analyses were performed. In all substrates tested, the crude concentration and the stability of the biosurfactant produced were determined in extremes conditions of temperature, pH and salinity. The results showed that the bacterium *Bacillus pumilus* was able to grow and produce biosurfactant with all substrates tested, reducing the surface tension to 46, 37, 47 and 32 mNm^{-1} with cassava, molasses, whey and sucrose, respectively. The biosurfactant was able to present emulsification rates of up to 50% with toluene and soybean oil. The crude production obtained was (g/L): 1.12; 0.35, 1.4 and 5.1 for cassava, molasses, whey and sucrose, respectively. The biopolymer produced was stable across variations in temperature, pH and salinity. In the large-scale fermentation with sucrose the production and properties of the biosurfactants obtained were better. The crude production was 7.0 g/L, surface tension of 26.3 mNm^{-1}, emulsification index of 50% and CMC of 0.9 g/L. The biosurfactant applied to a petroleum contaminated soil was capable of reducing the average fraction hydrocarbons by up to 52% and the heavy fraction hydrocarbons up to 95.6%. The bacterium *Bacillus pumilus* was able to produce a biosurfactant with interesting surface-active properties and with potential for application in bioremediation of oil-polluted soils.

Keywords: Biosurfactant, *Bacillus pumilus*, alternative substrates, bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. São moléculas que apresentam porções hidrofóbicas e hidrofílicas, ou seja, são moléculas anfipáticas. Em função da presença destes grupos na mesma molécula, tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo).

A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização, dispersão de fases e baixa toxicidade. Estas propriedades fazem os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais. A maior utilização se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene.

Alguns compostos de origem microbiana exibem propriedades surfactantes e são denominados biossurfactantes, os quais são subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras. São classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos.

Uma grande variedade de biossurfactantes é produzida por micro-organismos sendo que o tipo e a quantidade dependem do substrato utilizado como fonte de carbono e energia, e das condições de cultivo. A busca crescente pela qualidade dos tenso-ativos e a falta de custo competitivo no bioprocesso para utilização comercial motiva pesquisadores a desenvolverem estratégias rentáveis para a produção desta biomolécula. Apresentam a vantagem de serem sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Além disso, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, apresentando alta seletividade, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e maior compatibilidade com o ambiente. Estas vantagens fazem desses produtos biológicos moléculas alvo no que se refere a questões de gerenciamento ambiental e aplicações industriais.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Produzir biossurfactante com a bactéria *Bacillus pumilus* utilizando sacarose, manipueira, soro de leite e melaço como substratos;

- Avaliar a produção de biossurfactante em escala ampliada pela bactéria *Bacillus pumilus*;

- Verificar o potencial de aplicação do biossurfactante produzido em biorremediação de um solo agrícola contaminado com hidrocarbonetos.

Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros de produção de biossurfactante utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar o efeito das variáveis independentes: concentração do substrato, tempo de incubação, temperatura de incubação e agitação do meio de cultivo;

- Selecionar a melhor condição de cultivo para a produção de biossurfactante; e nesta avaliar a produção em escala ampliada;

- Verificar o potencial do biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus* em biorremediar hidrocarbonetos de fração média (HFM) e hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) do solo contaminado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfipáticas por possuírem uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, os quais pelo acúmulo na interface das fases imiscíveis podem reduzir a tensão superficial e interfacial (KHOPADE et al., 2012). Estas moléculas tenso-ativas apresentam a capacidade de aumentar a solubilidade e mobilidade de compostos hidrofóbicos ou compostos orgânicos insolúveis. Esta atividade de superfície faz dos surfactantes uma das mais importantes e versáteis classes de produtos químicos usados em uma variedade de aplicações (DELEU; PAQUOT, 2004). São usados amplamente para fins industriais, agrícolas, alimentos, cosméticos e aplicações farmacêuticas (FATHABAD, 2011; BEDNARSKI et al., 2004). Apresentam propriedades tais como, detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases.

Os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a carga iônica que reside na parte polar da molécula, podendo ser aniônica ou catiônica, não iônica ou anfotérica, e a porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais quartenários de amônio (catiônico) (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Surfactantes catiônicos, aniônicos e não iônicos são usados principalmente para produtos de limpeza. Destes, os aniônicos e não iônicos são pouco absorvidos pelo solo. Os tenso-ativos catiônicos são utilizados para diminuir a permeabilidade de materiais em aqüíferos por sorção (CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009).

A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene. No entanto, o custo de produção de surfactantes sintéticos não é acessível para seu uso em ecossistemas maiores (KIRAN et al., 2010), uma vez que a maioria dos surfactantes químicos convencionais é derivado de fontes não renováveis de petróleo sendo uma ameaça potencial ao meio ambiente devido à sua natureza recalcitrante (APARNA et al., 2012).

A eficácia dos surfactantes é determinada pela capacidade de reduzir a tensão superficial que é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária

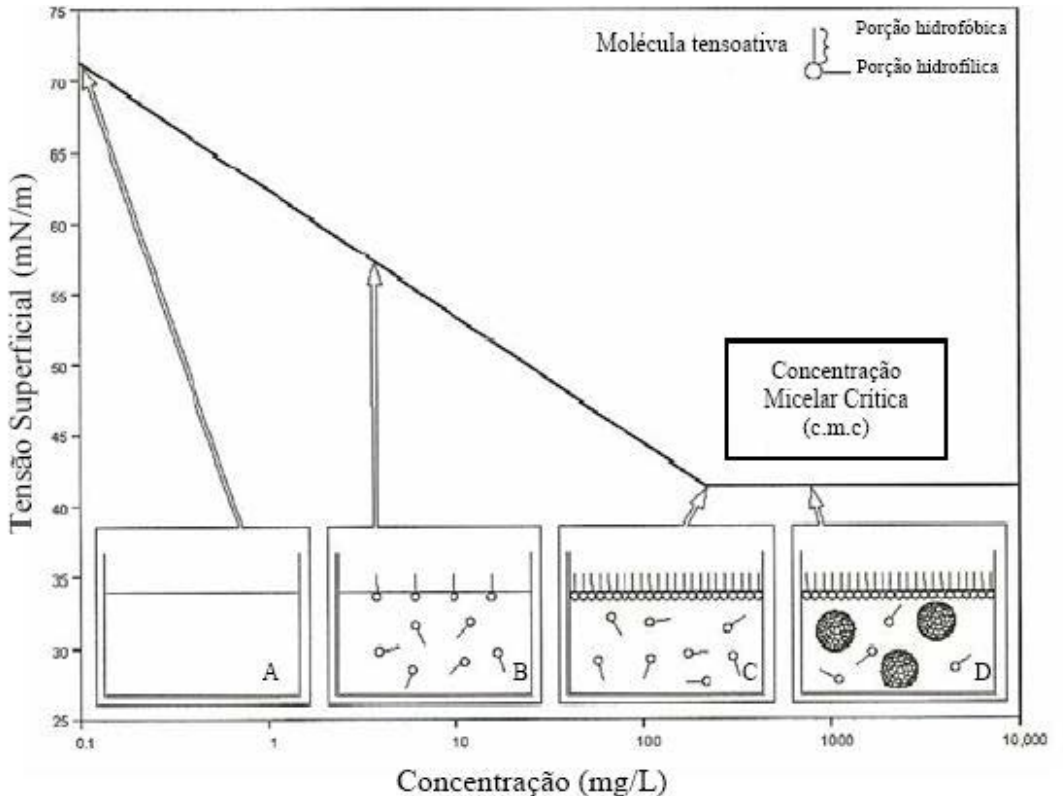
para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície. Devido à presença de surfactantes, menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície reduzindo, assim, a tensão superficial. Outra determinação importante é a concentração micelar crítica (CMC) que é um dos índices mais utilizados para avaliar a atividade surfactante. Esta é definida como a solubilidade de um tenso-ativo na fase aquosa, ou seja, a concentração mínima de tenso-ativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de agregados chamados de micelas (Figura 1). A tensão superficial entre a fase aquosa/oleosa muda muito pouco acima da concentração micelar crítica porque todas a moléculas de surfactantes adicionadas formam micelas (LIN, 1996).

A micelização é um processo comum a todos os surfactantes e é uma propriedade intrínseca e característica. A principal razão para a formação desses agregados é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água.

A formação de micelas pode resultar na solubilização de óleo e água, dando origem a uma emulsão. As propriedades únicas de micelas estão sendo exploradas em aplicações como a extração de proteínas do caldo de fermentação, remoção de íons metálicos e orgânicos a partir de solução aquosa e para aplicação ambiental. Após a CMC as micelas, ao contrário dos monômeros, ficam dispersas em toda a solução, não apresentando efeito sobre a tensão superficial da água (SANTOS et al., 2007).

Outro parâmetro freqüentemente utilizado para a avaliação do surfactante é o valor do balanço hidrofílico e lipofílico (HLB), pois essa relação afeta as propriedades físico-químicas das moléculas. O valor de HLB é uma indicação de solubilidade no óleo ou na água da solução, quanto menor for esse valor mais solúvel será o óleo presente na solução. Geralmente, tenso-ativos com valores de HLB inferiores a seis são mais solúveis na fase oleosa, HLB com valores entre 10 e 18 têm a característica oposta (PARKINSON, 1985).

Figura 1. Esquema do comportamento do tenso-ativo entre as fases líquida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a concentração micelar crítica (CMC) (SANTOS, 2007).



O grande leque de aplicação dos surfactantes aumenta a sua demanda mundial crescendo também o interesse em uma produção mais barata, uma vez que, os surfactantes são produzidos a partir do petróleo e requerem síntese e várias etapas de purificação o que torna o processo de alto custo. Entretanto, vários compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até micro-organismos (glicolipídios), sendo considerados surfactantes naturais.

Surfactante natural é um tenso-ativo proveniente diretamente de uma fonte natural. A fonte pode ser de origem animal ou vegetal onde se encontram em abundância, o produto deve ser obtido por algum tipo de separação como procedimentos de extração, precipitação ou destilação. Atualmente não existem muitos tenso-ativos em uso que preencham esses requisitos. A Lecitina, obtida a partir de soja ou da gema de ovo, é provavelmente o melhor exemplo de um verdadeiro surfactante natural. Nos sistemas biológicos estas moléculas são usadas da mesma forma que são empregadas em sistemas

técnicos, ou seja, para melhorar a solubilidade e como agentes emulsificantes e dispersantes. Porém, o alto custo de produção em escala industrial, e o fato delas estarem presentes normalmente em pequenas quantidades aumentariam o custo de produção. (HOLMBERG, 2001).

Nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica. Entretanto, existe uma tendência crescente pela substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais (SANTOS et al., 2010). Essa tendência é movida pela busca de se obter um produto o mais compatível possível com o meio ambiente, e pela necessidade de substituição de moléculas não biodegradáveis que são poluentes à natureza. O desenvolvimento desta linha de pesquisa é de importância primordial, principalmente tendo em vista a preocupação em relação à proteção do meio ambiente (KHOPADE 2012).

3.2 BIOSSURFACTANTES

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes (YAKIMOV et al., 1998; TRAVASI et al., 2011). A maioria dos biossurfactantes é produzida por bactérias, leveduras e fungos durante o crescimento em várias fontes de carbono (FIECHTER, 1992). A diversidade existente entre os micro-organismos produtores de biossurfactante sugere que a produção representa uma importante estratégia de sobrevivência e parece ter evoluído de forma independente (BODOUR et al., 2003). A excreção dos biossurfactantes no meio possibilitaria aos micro-organismos maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996), porém, a razão exata destes micro-organismos produzirem biossurfactantes não é sempre tão óbvia.

Em micro-organismos degradantes de petróleo os biossurfactantes são produzidos extracelularmente (BOUCHEZ et al., 1999; YAKIMOV et al., 1998). Neste caso, biossurfactantes tem a função de facilitar a captação do substrato pela célula microbiana e de degradação e emulsificação de hidrocarbonetos (KOCH et al., 1991). Outra possível explicação para a produção de biossurfactantes é que são produzidos como antibióticos para proteção das células contra ataques de outros micro-organismos.

Na natureza os biossurfactantes desempenham um papel fisiológico no aumento da disponibilidade de moléculas hidrofóbicas, estão envolvidos fornecendo substratos para o crescimento de outras bactérias, participam em processos fisiológicos de sinalização e diferenciação celular (KEARNS; LOSICK, 2003). Desempenham outras funções fisiológicas como emulsificação, solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de micro-organismos nestes substratos. Os micro-organismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos locais com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis, (ROSENBERG; RON, 1999).

Estes compostos biotecnológicos (biossurfactantes) são produzidos extracelularmente ou pela membrana celular de bactérias ou leveduras cultivadas em meio contendo uma fração de uma fonte de carbono hidrofóbico (HOMMEL, 1990). São produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de micro-organismos em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou misturas destes (CALVO et al., 2009).

De acordo com Gudiña e colaboradores (2010), surfactantes microbianos incluem um grupo diverso de moléculas tenso-ativas que são classificadas de acordo com sua origem microbiana e composição química. Assim, na natureza a fonte de carbono e nitrogênio são limitações nutricionais e, parâmetros físicos como temperatura, aeração e pH influenciam no tipo de polímero produzido (CALVO et al., 2009). Essa característica é extremamente importante porque abre caminhos para futuras descobertas de novos compostos e para potencializar a produção destes, desta forma, um melhor conhecimento da composição química é necessária para entender plenamente os seus componentes ativos e ser capaz de modificá-los, a fim de melhorar suas propriedades. A identificação e otimização das condições de cultivo que afetam a produção da biomolécula representam pontos-chave para o desenvolvimento de um processo de custo competitivo (MUKHERJEE; DAS, 2006).

As pesquisas com biossurfactantes são direcionadas para estudar as propriedades e comportamento da molécula em fase aquosa (HELVACI et al., 2004; ÖZDEMIR; MALAYOGLU, 2004a; ÖZDEMIR et al., 2004b). Comumente apresentam as vantagens de biodegradabilidade, baixo índice de toxicidade, resistência ao pH e mudanças de temperatura e biocompatibilidade em comparação com surfactantes produzidos

sinteticamente (ROSENBERG; RON, 1999; BANAT et al., 2000; LAI et al., 2009; KIRAN et al., 2010). Desta maneira, a produção de biossurfactante tem sido alvo de pesquisas nas últimas décadas (CHEN et al., 2012). Outra vantagem reside no fato de serem compostos não derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo não são estáveis. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Além destas vantagens estas moléculas podem ser sintetizadas a partir de substratos renováveis o que reduziria um dos fatores limitantes, o custo de produção. E possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Como desvantagem os biossurfactantes apresentam a dificuldade na seleção de um resíduo com composição adequada de nutrientes que permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse, sendo necessária a padronização do processo biotecnológico. Além disso, alguns fatores interferem na produção: apresentam baixos rendimentos, necessidade de grande investimento de capital, necessidade de um sistema estéril, alguns problemas no controle do processo, na recuperação e purificação do produto e análise química devido a sua complexidade (CALVO et al., 2009).

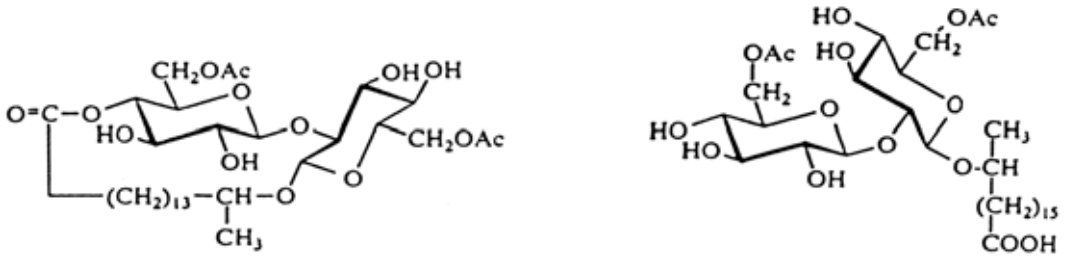
Estas moléculas incluem uma grande variedade de compostos, glicolipídios, lipoproteínas, polipeptídios complexos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa. Esta porção pode ser saturada, insaturada ou de ácidos graxos hidroxilados (NGUYEN et al., 2008), enquanto que a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, um fosfato, um ácido carboxílico ou um álcool.

De acordo com Darvishi e colaboradores (2011), biossurfactantes são geralmente agrupados de acordo com o peso molecular, os de baixo peso molecular incluem lipopeptídios, glicolipídios, flavolipídios, fosfolipídios e ácidos graxos, enquanto os biossurfactantes de alto peso molecular são referidos como bioemulsificantes e são compostos de polissacarídios, proteínas, lipopolissacarídios e lipoproteínas.

Glicolipídios são geralmente ácidos graxos hidroxilados ligados com açúcar via ligação glicosídica, soforolipídios e ramnolipídios são exemplos bem conhecidos que são

produzidos por *Pseudomonas* e *Candida* (WEBER et al., 1990). A Figura 2 mostra um soforolipídio cíclico e um acíclico. Ramnolípidios podem ser eficientemente produzidos durante o crescimento em hidrocarbonetos ou carboidratos como uma única fonte de carbono (HOLMBERG, 2001).

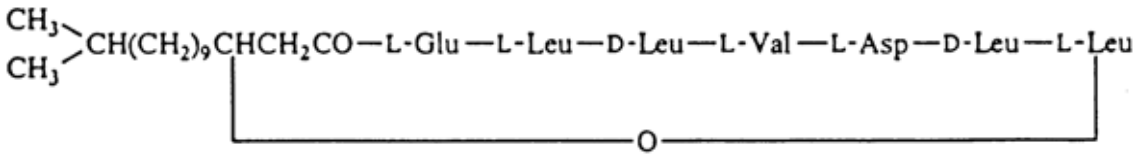
Figura 2. Um soforolipídio cíclico e um acíclico (HOLMBERG, 2001).



Entre as diferentes classes de biossurfactantes os ramnolipídios pertencentes ao grupo dos glicolipídios têm sido muito estudados por serem promissores em algumas características como na redução da tensão superficial e na capacidade de degradação de hidrocarbonetos (APARNA et al., 2012; GOLVEIA et al., 2003).

Os lipopeptídeos geralmente são cíclicos e estão compostos por um ácido hidroxilado e uma cadeia peptídica curta. Um exemplo extensivamente estudado é a surfactina (Figura 3) que é produzida pela bactéria *Bacillus subtilis*, com propriedades altamente eficientes para aplicações industriais. Esta é usada para uma variedade de aplicações farmacológicas (VOLLENBROICH, 1997).

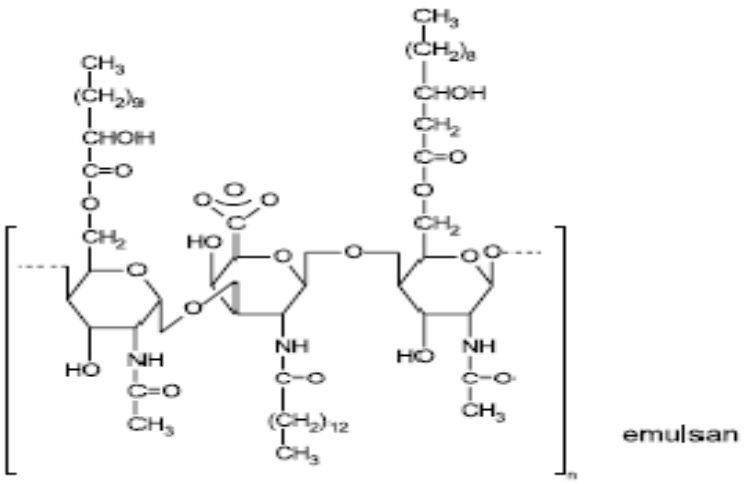
Figura 3. Surfactina produzida por *Bacillus subtilis* (HOLMBERG, 2001).



Os biossurfactantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos diferentes como, por exemplo, o emulsan, no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos (Figura 4) ou o liposan de *Candida lipolytica*, constituído por carboidratos e proteínas. Os biossurfactantes poliméricos são promissores

para a produção de fármacos, cosméticos e alimentos, porque são capazes de formar emulsões estáveis que são difíceis de romper.

Figura 4. Emulsan, biossurfactante polimérico (NITSCHKE; PASTORE, 2002).



3.2.1 Aplicações dos biossurfactantes

3.2.1.1 Biorremediação

Atualmente existe uma grande preocupação e maior conscientização da sociedade em relação ao meio ambiente e a qualidade deste, além de uma crescente demanda no gerenciamento das questões ambientais. Dessa forma avanços significativos são observados nos estudos que visam à recuperação ambiental. Os biossurfactantes, pelo fato de terem uma origem biológica e apresentarem melhor biocompatibilidade e biodegradabilidade, apresentam um grande número de aplicações potenciais. São vistos como bons candidatos para o uso na biorremediação de solos contaminados porque têm a capacidade de aumentar a solubilidade e a mobilidade de compostos hidrofóbicos ou compostos orgânicos insolúveis facilitando a assimilação pelos micro-organismos.

O uso de atividade biológica para eliminação de poluentes ambientais é descrito como biorremediação, e envolve o melhoramento do processo de biodegradação dos contaminantes (SINGH et al., 2007). A biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. Essa tecnologia é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por micro-organismos. Este

processo apresenta inúmeras vantagens em relação a outros processos empregados para remover a poluição (extração com solventes, adição de oxidantes químicos, etc.), sendo um dos métodos mais eficientes para tratar ambientes poluídos (RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, 2013).

As estratégias de biorremediação incluem: a utilização de micro-organismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural), isto evita custo e distúrbios ambientais associados com movimentos de solos e águas para outros locais destinados ao tratamento; a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos (BENTO et al., 2003). O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa. O mecanismo de ação e a eficiência do surfactante na biodegradação do poluente mudarão dependendo da espécie de micro-organismo presente.

Existem algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes, como altos níveis de concentração de agentes poluidores, falta de oxigênio, pH, temperatura, baixa umidade desfavorável e falta de nutrientes minerais. Uma vez que estas condições são corrigidas, a distribuição natural de micro-organismos permite um crescimento espontâneo apropriado favorecendo, assim, uma melhora na remediação do contaminante.

O princípio básico de métodos para remoção consiste na mobilização e / ou a solubilização de hidrocarbonetos através da redução da tensão superficial nas interfaces das fases orgânica - solo e orgânica – água; em geral, a remediação por surfactantes no solo é feita removendo moléculas orgânicas adsorvidas e aprisionadas nos poros, seguida pelo encapsulamento dentro de micelas formadas em concentração maior que a concentração micelar critica (CMC) (CHU; CHAN, 2003).

No trabalho realizado por Bicca e colaboradores, (1999), foi avaliada a produção de biossurfactantes por cinco cepas de *Rhodococcus* isoladas de sítios de prospecção de óleo. A medição da tensão superficial e o índice de emulsificação foram usados para identificar a produção de biossurfactante. Investigou-se também a influência de condições ambientais: pH, temperatura, composição do meio, e o tipo de fonte de carbono no crescimento celular e na produção. Este trabalho indicou a possibilidade do uso de uma das cepas diretamente em derrames de óleo no ambiente ou na produção biotecnológica de biossurfactantes. Segundo Travasi e colaboradores (2011), a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* é capaz de

produzir um biossurfactante que por si só promove a biodegradação de petróleo bruto em larga escala sem a adição de fertilizantes.

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na capacidade dos micro-organismos metabolizarem determinadas moléculas especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. A solubilidade de hidrocarbonetos depende de muitos fatores: o tipo e a quantidade de surfactante e a taxa de contaminação (BENTO et al., 2003).

Estudos sobre a remoção de hidrocarbonetos por surfactantes indicam o efeito de vários fatores, como por exemplo, precipitação e adsorção do surfactante no terreno, solubilização do contaminante e condutividade hidráulica do solo (DWARAKANATH et al., 1999), influência da textura e qualidade do solo sobre a remoção de contaminantes orgânicos (LEE et al., 2002). Indicam também influência do pH e concentrações de amônia na atividade de biossurfactantes na biorremediação (WHANG et al., 2008).

A estrutura do solo determina a capacidade de transferência da água e nutrientes para as áreas bioativas, conseqüentemente, a presença de biossurfactantes no solo pode produzir um efeito positivo na forma de estimular a dissolução, solubilização, ou mesmo de emulsificação dos hidrocarbonetos (CALVO et al., 2009).

Khalladi e colaboradores (2009) estudaram a remoção de óleo diesel de solo em coluna de vidro por um processo de lavagem contínuo, com o objetivo de remover o óleo contaminante usando uma solução de água com surfactante aniônico para determinar o modelo cinético do diesel no solo. Os resultados demonstraram que a presença de minerais no solo melhorou a atividade do surfactante na superfície, demonstrando, assim, o efeito da composição do solo sobre a eficiência do surfactante durante a reabilitação deste.

A água disponível para o crescimento microbiano e o metabolismo também é fator limitante no processo da biodegradação do hidrocarboneto. A diminuição no teor de umidade resulta em uma diminuição na atividade microbiana (AYOTAMUNO et al., 2006). Geralmente, ocorre ótima atividade quando a umidade do solo é de 50-80% de saturação (CALVO et al., 2009).

O petróleo, cada vez mais explorado comercialmente, aumenta o risco de contaminação ambiental devido o transporte, estocagem e distribuição. Tal ocorrência motiva a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de sítios contaminados. Muitos países apresentam problemas ambientais; o Brasil tem noticiado alguns desastres ecológicos, fato que causa aumento do interesse sobre os impactos reais e potenciais de

atividades humanas em ecossistemas marinhos e terrestres. É uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo os hidrocarbonetos a fração majoritária e uma pequena porção de hidrogênio, nitrogênio e oxigênio. De acordo com a sua origem, as suas composições químicas e as suas propriedades físicas variam de um campo petrolífero para outro (ANDRADE et al., 2010).

Nas refinarias, o petróleo passa por uma série de processos até a obtenção de produtos derivados como gasolina, nafta e solventes, aumentando a complexidade da mistura e dificultando a remoção. Compostos de interesse que exigem maior preocupação ambiental são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, esses compostos, conhecidos também como BTEX, são usados, principalmente, em solventes e em combustíveis e são os constituintes mais solúveis na fração da gasolina. Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, além dos BTEX, geralmente, outras classes de compostos também são alvos de atenção, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os compostos orgânicos voláteis (COV) totais e os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Os compostos BTEX, HPA e HTP são escolhidos, principalmente, pela toxicidade, mobilidade e persistência no meio ambiente; os COV totais, por representarem o total de emissões gasosas, como perdas por volatilização provenientes do derramamento (ANDRADE et al., 2010).

Devido principalmente, ao alto grau de complexidade dessa mistura, normalmente o tratamento das áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemático, baseado neste fato, os biossurfactantes tornam-se moléculas interessantes para solução de problemas ambientais. Particularmente o México tem severos problemas de poluição de água, solo e atmosfera devido à contaminação por compostos orgânicos e inorgânicos (MARTÍNEZ-TOLEDO; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, 2013) sendo os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) considerados compostos de alta prioridade que deveriam ser removidos das áreas poluídas. HTPs são uma mistura de poluentes, e no solo, eles representam um risco para a saúde das pessoas e do ecossistema (DOF, 2005).

3.2.1.2 Outras aplicações

As propriedades físico-químicas, características dos biossurfactantes, fazem que a indústria petrolífera seja o maior mercado, pois podem ser utilizados na produção de

petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (VAN DIKE et al., 1991). Entre as aplicações industriais, uma que se destaca é a recuperação melhorada do petróleo (MEOR), que consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza micro-organismos ou produtos do seu metabolismo para a recuperação do óleo residual. Os micro-organismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo–rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo nas rochas (NEVES et al., 2004).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de micro-organismos produtores no reservatório e subseqüente propagação *in situ*, ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento dos micro-organismos produtores de biossurfactantes (NEVES et al., 2004).

Os biossurfactantes podem ser explorados em várias aplicações no processamento de alimentos. A emulsificação tem papel importante na formação da consistência e textura, bem como, na dispersão de fases e na solubilização de aromas. Nos alimentos, além do seu papel óbvio, como agentes que diminuem a tensão superficial e interfacial, os surfactantes promovem a formação e estabilização de emulsões. Porém podem ter outras funções: para controlar a aglomeração de gordura, estabilizar sistemas gasosos, melhorar a textura e o período de vida útil de produtos contendo amido, modificar as propriedades reológicas da farinha de trigo e das massas e melhorar a textura de produtos à base de gordura. Neste contexto se enquadram em processos de panificação e produtos derivados de carne (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MUTHUSAMY et al., 2008).

Outra aplicação para biossurfactantes é na indústria de laticínios onde retardam a colonização de *Streptococcus thermophilus* responsável pelo cheiro ou gosto ruim durante a pasteurização (BANAT et al., 2000). Alguns biossurfactantes já estão sendo utilizados comercialmente, por exemplo, o bioemulsificante produzido por *Candida utilis* que tem sido usado em molhos industriais para saladas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Uma abordagem interessante para a indústria alimentar é o uso de seus subprodutos ou resíduos como substratos para a produção de biossurfactantes, uma vez que esses resíduos geralmente contêm altos níveis de carboidratos ou lipídios, necessários para apoiar o crescimento microbiano e a síntese dessas moléculas. Além disso, os altos custos de tratamento e eliminação desses resíduos são significativos às indústrias que freqüentemente estão buscando alternativas para reduzir, reutilizar, reciclar e valorizar os

seus resíduos. Na literatura, alguns tipos de surfactantes produzidos a partir de resíduos têm sido publicados. As principais fontes são oleosas, resíduos de indústrias lácticas e resíduos ricos em carboidratos. Em 2009, Daverey e Pakshirajan, potencializaram a produção de soforolipídio pela levedura *Candida bombicola* utilizando meios de baixo custo.

Muitos biossurfactantes são descritos na literatura como agentes antimicrobianos como, por exemplo, surfactina que é produzida pela bactéria *Bacillus subtilis,* (FERNANDES et al., 2007); esta também possui várias aplicações terapêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas, atividade antitumoral (ARIMA et al., 1968; PEYPOUX et al., 1999). A surfactina possui atividade bactericida, fungicida, antiviral, agente antitumoral, atua como inibidor da formação de coágulos fibrinosos, antimicoplasmático, veículo para administração de drogas via pulmonar e é capaz de inibir a formação de biofilmes de algumas bactérias (BARROS et al., 2007).

Outro exemplo de biossurfactante com propriedade antimicrobiana é o ramnolipídio utilizado em estudos contra *Listeria monocytogenes* onde foi verificado o potencial de inibição da aderência em superfícies de poliestireno em 100%, sugerindo o uso do mesmo no controle microbiano (ARAÚJO et al., 2011). Magalhães e Nitschke (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano desta biomolécula frente à *Listeria monocytogenes*. Os resultados demonstraram potencial para aplicação antimicrobiana contra esse micro-organismo e efeito sinérgico quando associado ao composto nisina. A utilização de biossurfactantes no controle de biofilmes, reduzindo a aderência em combinação com antibióticos pode representar uma estratégia antimicrobiana, uma vez que os antibióticos são em geral menos eficazes contra os biofilmes (IRIE et al., 2005).

Biossurfactantes têm sido avaliados para inibir a adesão de micro-organismos patogênicos em superfícies sólidas ou em sítios de infecção (DAS et al., 2009). A adesão dos micro-organismos *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em catéteres frente soluções de surfactina foram avaliados, resultando em decréscimo da adesão e crescimento microbiano (RODRIGUES et al., 2004).

Na agricultura os biossurfactantes podem ser usados especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas, devido aos compostos ativos serem geralmente hidrofóbicos fazendo-se necessário o uso de agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Também podem ser usados no controle biológico, Ghribi e colaboradores (2012)

verificaram potencial larvicida de um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* contra uma lepidoptera, o qual poderia ser explorado para formulação de um novo pesticida.

Além destes, têm sido realizados estudos a fim de avaliar o potencial de remoção de metais pesados do solo usando biossurfactantes (ASFÇE et al., 2008; CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009). Em um trabalho realizado por Zouboulis e colaboradores (2003), foi avaliado o potencial de remoção de íons de zinco e cromo de soluções aquosas por biossurfactante em comparação com outro tenso-ativo quimicamente similar, verificou-se que melhor flotabilidade dos metais foi obtida quando foi usado biossurfactante. Em 2007, Juwarkar e colaboradores realizaram um estudo que demonstrou que a tecnologia do uso de biossurfactante pode ser um método não destrutivo e eficaz para biorremediação de solo contaminado com cádmio e chumbo.

Na indústria de cosméticos alguns produtos já incluem surfactantes: antitranspirantes, pastas de dente, anti-sépticos, batons, “shampoos”, produtos de depilação e hidratantes (SCHARAMM et al., 2003). Estes poderiam ser substituídos por biossurfactantes devido à compatibilidade com a pele, onde a maioria tem ação umectante, ação espumante, ação solubilizadora e atuam como mediadores de ação enzimática.

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil, cerâmica e na fabricação de extintores de incêndio (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

3.2.2 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Os micro-organismos produzem uma extensa variedade de materiais tenso-ativos com diferentes estruturas moleculares (Tabela 1). Dentre os fatores que interferem na produção e no nível de expressão estão, além da genética do micro-organismo, as condições ambientais e a natureza do substrato (MULLIGAN, 2005).

Enquanto a procura por novas espécies produtoras de biossurfactantes proporciona uma ampla variedade de moléculas tenso-ativas biossintéticas, a otimização das condições de cultivo também desempenha um papel importante no rendimento da produção. Segundo Georgiou e colaboradores (1992), uma grande variedade de micro-organismos produz biossurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade são influenciadas pela natureza do substrato, concentração dos íons no meio de cultura, além das condições de cultivo.

Em vários casos, foi demonstrado que a produção de emulsificantes é induzida por moléculas envolvidas em sinais de “quorum sensing”. Esta regulação característica parece ser geral, e provavelmente aplica-se a produção de emulsificantes de altos e baixos pesos moleculares. Como todos os casos a produção é concomitante com o aumento da densidade celular e do surgimento da fase estacionária de crescimento (ROSEMBERG; RON, 1999; BRINT; OHMAN, 1995; VAN DELDEN et al., 1998).

Um dos glicolipídios mais estudados é o ramnolipídio, produzido por várias espécies de *Pseudomonas*. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* isoladas do meio ambiente (em geral águas de esgoto), comprovaram em laboratório a produção de enzimas lipolíticas (lipases) e substâncias biossurfactantes. Este ramnolipídio tem sido aplicado em várias indústrias e processos de biorremediação devido a sua alta atividade emulsificante e sua atuação na redução da tensão superficial de até 30 mNm^{-1} (WEI et al., 2005). Chakrabarty (1985) mostrou que um emulsificante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* SB30 pode dispersar petróleo em finas gotículas o que facilita a biodegradação.

Em 2009, Pomsunthorntawee e colaboradores avaliaram a capacidade de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* SP4, que foi isolada a partir de solo contaminado com petróleo na Tailândia. Os resultados demonstraram potencial para produção em grande escala.

Muitos outros autores relatam produção de biossurfactante com propriedades interessantes pelo gênero *Pseudomonas* utilizando diferentes substratos (COSTA et al., 2010; APARNA et al., 2012; DUBEY et al., 2012; ABBASI et al., 2012).

Tabela 1. Tipo e origem microbiana dos biossurfactantes (MULLIGAN, 2005).

Tipo de biossurfactante	**Micro-organismos**
Lipídios trealose	*Arthrobacter paraffineus,* *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Rhodococus erythropolis, Nocardia* sp.
Ramnolipídios	*Pseudomonas aeruginosa,* *Pseudomonas* sp., *Serratia rubidea*
Soforolipídios	*Candida apícola, Candida bombicola,* *Candida lipolytica,Candida bogoriensis*
Glicolipídios	*Alcanivorax borkumensis,* *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *R. erythropolis, Serratia marcescens,* *Tsukamurella* sp.
Lipídios celobiose	*Ustilago maydis*
Lipídios poliol	*Rhodotorula glutinus,* *Rhodotorula graminus*
Diglicosil diglicerídios	*Lactobacillus fermentii*
Lipopolissacarídios	*Acinetobacter calcoaceticus* (RAG1) *Pseudomonas* sp., *Candida lipolytica*
Artrofactina	*Arthrobacter* sp.
Liquenisina A e B	*Bacillus licheniformis*
Surfactina	*Bacillus subtilis, Bacillus pumilus*
Viscosina	*Pseudomonas fluorescens*
Ornitina, peptídiolisina	*Thiobacillus thiooxidans,* *Streptomyces sioyaensis,* *Gluconobacter cerinus*
Fosfolipídios	*Acinetobacter* sp.
Sulfonilipídios	*T. thiooxidans, Corynebacterium* *alkanolyticum*
Ácidos graxos (ácidos corinomicólicos, ácidos espiculispórico, etc.	*Capnocytophaga* sp., *Penicillium spiculisporum,* *Corynebacterium lepus,* *Arthrobacter paraffineus,* *Talaramyces trachyspermus,* *Nocardia erythropolis*
Alasana	*Acinetobacter radioresistens*
Estreptofactina	*Streptomyces tendae*
Surfactante particulado (PM)	*Pseudomonas marginalis*
Biosur PM	*Pseudomonas maltophilla*

Desde 1998, uma nova classe de glicolipídios produzidos pelo micro-organismo *Alcanivorax borkumensis* foi descrita (ABRAHAM, 1998). O gênero *Rhodococcus* é capaz de transformar, biodegradar ou utilizar como fontes de carbono vários compostos hidrofóbicos (hidrocarbonetos, esteróides, lignina, etc.), produzindo glicolipídios contendo trealose como carboidrato. Seu biossurfactante tem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial a níveis observados nos surfactantes sintéticos, além de possuir baixa CMC. Cepas de *Rhodococcus ruber* e *Rodhococcus erythropolis* são capazes de produzir essa biomolécula em escala comercial para a utilização no controle da poluição (BICCA et al., 1999). Em 2011, Shavandi e colaboradores, verificaram potencial emulsificante do biossurfactante produzido por *Rodhococcus sp*, este foi capaz de formar emulsões estáveis com vários hidrocarbonetos e ser estável sob diversos parâmetros físicos.

Membros do gênero *Bacillus* são considerados um grupo promissor para a síntese industrial de biossurfactantes porque as espécies pertencentes a este táxon são conhecidas por produzirem metabólitos tenso-ativos (AL-BAHRY et al., 2012).

Um exemplo de biossurfactante lipoproteico é a surfactina, um biossurfactante produzido por *Bacillus subtillis* e é um dos produtos mais conhecidos entre os tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos com aplicação comercial (YEH et al., 2005). Na Índia em 2007, Joshi e colaboradores realizaram a produção de biossurfactantes com *Bacillus subtilis* 20B isolado de alimentos fermentados e foi verificada e discutida uma possível aplicação do biossurfactante em recuperação de óleos.

Em 2003, Queiroga e colaboradores observaram a redução da tensão superficial de 53 mNm^{-1} para 25,7 mNm^{-1} em função da produção de biossurfactantes produzido por *Bacillus subtilis* na presença de petróleo como substrato. Esta bactéria também apresenta grande produção de surfactina utilizando água residuária de mandioca como substrato, o biopolímero produzido mantém emulsões estáveis com vários hidrocarbonetos. Este substrato provou ser eficiente para a biossíntese e acúmulo do tenso-ativo (NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Recentemente foi verificada a produção de surfactina por *Bacillus pumilus* em fermentação em estado sólido, com propriedades tenso-ativas similares à descrita na literatura utilizando fermentação submersa (SLIVINSKI et al., 2012).

Em 2008, Lee e colaboradores isolaram *Klebsiella* spp. produtora de um lipopeptídio a partir de resíduos de óleo de soja. Este biossurfactante apresenta melhor estabilidade e melhor emulsificação quando comparado a um surfactante sintético.

Chromobacterium violaceum pertence ao grupo das bactérias Gram-negativas, facultativa anaeróbica, esta bactéria destaca-se por apresentar grande potencial para diversas aplicações biotecnológicas, entre elas a produção de biossurfactante utilizando substratos alternativos como óleo de pequi (BARBOSA; PAZ, 2007).

Dentre as leveduras, as espécies do gênero *Candida* têm sido largamente utilizadas com sucesso para a produção de biossurfactantes, dentre elas a *Candida bombicola* tem-se destacado como produtora. Em um estudo realizado por Daverey e Pakshirajan (2009) utilizando resíduos de baixo custo como melaço e óleos, foi obtido um biossurfactante soforolipídio por esta espécie.

Bednarski e colaboradores (2004) induziram a produção de glicolipídios por *Candida antarctica e Candida apicola* a partir de resíduos do refino de óleo e o biossurfactante produzido foi capaz de reduzir consideravelmente a tensão superficial do meio. *Candida catenulata* é um micro-organismo com potencial para biorremediação de solos contaminados com óleo e resíduos alimentares através de processos de compostagem, sugerindo que esse micro-organismo é produtor de algum agente tenso-ativo (JOO et al., 2008). O biossurfactante produzido por *Candida antarctica* utilizando n- alcanos como substratos demonstrou ser eficiente porque influenciou positivamente a emulsificação e biodegradação destes compostos (HUA et al., 2003). O biossurfactante (glicolipídio aniônico) produzido por *Candida sphaerica* UCP0995, foi capaz de reduzir a tensão superficial, manter estabilidade em relação ao pH e apresentar alta atividade emulsificante (SOUZA SOBRINHO et al., 2008).

Aragão e colaboradores (2007) estudaram duas espécies de leveduras, *Pichia membranaefaciens e Pichia anomala*, que foram cultivadas em meio mineral contendo 2% de glicerol e obtiveram a produção de biossurfactantes, ocorrendo o mesmo quando gasolina e querosene foram adicionados como substratos.

A espécie *Pseudozyma fusiformata* produz um biossurfactante termoestável de baixo peso molecular com propriedade fungicida (LANG, 2002). Em um trabalho realizado por Fukuoka e colaboradores (2008) uma levedura do gênero *Pseudozyma* apresentou potencial para produzir um glicolipídio.

Biossurfactantes produzidos por micro-organismos marinhos têm recebido atenção especial para a biorremediação do oceano. Em 2005, Maneerat descreveu que os biossurfactantes provenientes desses micro-organismos são agentes promissores na biorremediação de hidrocarbonetos, principalmente petróleo. Recentemente, Khopade e colaboradores, (2012) verificaram o potencial de produção de um biossurfactante por *Nocardiopsis* sp. B4 (micro-organismo marinho) com propriedades interessantes para aplicações industriais.

A produção de um biossurfactante caracterizado como glicoproteína de um fungo marinho *Aspergillus ustus* isolado da costa da Índia foi verficada, este tenso-ativo apresentou amplo espectro de atividade antimicrobiana, assim como alto potencial para aplicação ambiental (KIRAN et al., 2009). Logo em 2010, Kiran e colaboradores caracterizaram um novo biossurfactante lipopeptídico produzido por uma actinobactéria marinha chamada *Brevibacterium aureum* em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais, este biossurfactante também foi sugerido por estes autores para recuperação de ambientes marinhos.

Recentemente bactérias alcalifílicas, também desempenham papel importante em descobertas de novos biopolímeros. A bactéria *Cronobacter sakazakii*, isolada de água residuária contaminada com óleo, demonstrou potencial para produção de um biossurfactante com interessantes propriedades para diversas aplicações industriais e principalmente demonstrou ser forte candidato para aplicações em desastres ecológicos (JAIN et al., 2012).

Nesta mesma vertente, bactérias termofílicas como, por exemplo, *Alcaligenes faecalis* (BHARALI et al., 2011), e bactérias ácido láticas do gênero *Lactobacillus* (GUDIÑA et al., 2010; TRAVASI et al., 2011) também demonstraram potencial de produção de tenso-ativos com interessantes aplicabilidades médicas e ambientais.

3.3 *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus é uma bactéria Gram-positiva aeróbia, formadora de esporos. A ocorrência desse micro-organismo se dá em solo, água, ar e tecidos vegetais em decomposição, são freqüentemente encontrados em simbiose no desenvolvimento radicular

de plantas. Esta bactéria é produtora de varias moléculas, como biossurfactantes, proteases, lignocelulases e uma variedade de toxinas e antibióticos.

De acordo com Peypoux e colaboradores (1999), *B. pumilus* produz um lipopeptídeo da família da surfactina, chamado de pumilacidina. Em 2000, Banat e colaboradores reportaram somente *B. subtilis* e *B. pumilus* como produtores de surfactina. Slivinski e colaboradores (2012) reportaram a produção de surfactina pela bactéria *Bacillus pumilus* por fermentação em estado sólido utilizando um meio de cultivo a base de bagaço de cana, esta apresentou propriedades similares à surfactina produzida em fermentação submersa.

Bueno (2008) isolou vários micro-organismos de amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos para avaliar a produção de biossurfactantes. Nesta pesquisa o micro-organismo que melhor produziu biossurfactante foi a bactéria identificada como *Bacillus pumilus* utilizando como fonte de carbono baixas concentrações de sacarose, adicionado de óleo diesel como indutor.

Em um trabalho realizado por Bento e colaboradores (2005), foram caracterizados biossurfactantes produzidos por populações microbianas de solos dos Estados Unidos e da China contaminados com óleo diesel. Dentre as bactérias produtoras *B. pumilus* foi a bactéria que reduziu significativamente a tensão superficial, e aumentou a emulsificação em 59%.

Biossurfactantes produzidos por *Bacillus pumilus* em amostra isolada a partir de resíduos de óleo, demonstraram que esta bactéria pode ser um agente promissor para aplicação ambiental (CALVO et al., 2009).

Já o *B. pumilus*, apresentou efeito fungicida impedindo a germinação dos esporos de certos fungos, constituindo uma barreira física entre a planta e os esporos fúngicos. Neste contexto, esse micro-organismo é estudado para o biocontrole de doenças de plantas, os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* apresentam uma vasta gama de potenciais fitopatógenos, incluindo bactérias, fungos e *oomycetes*. Estudos também apontam que essas moléculas apresentam um papel fundamental no processo de interação entre as espécies de *Bacillus* e a planta hospedeira estimulando mecanismos de defesa (ORGENA; JACQUES, 2007).

Esse micro-organismo é grande produtor de lignocelulases (POORNA; PREMA, 2006). Além de ser uma das espécies mais utilizadas para a produção de proteases que são

usadas na coagulação do leite de soja (AOYAMA et al., 2000) e na limpeza de membranas de filtragem.

O *Bacillus pumilus* também é uma bactéria relatada como produtora de toxinas, experimentalmente associadas à clindomicina (BROPHY; KNOOP, 1982). Hoult e Tuxford (1991) realizaram estudos da produção de toxinas de duas amostras de *Bacillus pumilus* (M11, M38) em comparação com outras bactérias, avaliaram efeito citopático em células "Vero" e atividade hemolítica.

Em um trabalho realizado por Cho e colaboradores (2009) *Bacillus pumilus* apresentou atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus e Staphylococcus aureus*. O antibiótico produzido foi designado bacitracina. Este estudo revelou que *B. pumilus* pode ser proposto como uma boa linhagem para a produção deste composto que é exclusivamente ativo contra bactérias Gram-positivas. Esta bactéria também apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, dois contaminantes comuns de alimentos a base de soja, o composto que foi antifúngico foi semelhante ao lipopeptídio iturina.

Em um trabalho realizado por Aly e colaboradores (2008) o micro-organismo *B. pumilus* demonstrou ser um agente promissor como um probiótico no controle de infecções de *Aeromonas hydrophila* no peixe *Oreochromis niloticus*. Os resultados deste trabalho demonstraram que a utilização de *Bacillus pumilus* em suplementos alimentares aumentou a sobrevivência do peixe e é uma abordagem útil no reforço da resistência contra infecções.

3.4 SUBSTRATOS

A biotecnologia facilita a síntese de determinados produtos em favor da natureza, é um ramo muito amplo da tecnologia que se ocupa da transformação ou tratamento de materiais de origem biológica. A tendência é de incluir no termo biotecnologia, em seu aspecto mais essencial, a microbiologia industrial, que trata do aproveitamento dos micro-organismos como agentes de degradação e síntese. As novas técnicas passam a estimular as células para que usem substratos alternativos (MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes são com freqüência produzida por micro-organismos capazes de crescer em hidrocarbonetos que, além de estimular o crescimento, aceleram a

biorremediação. Esses micro-organismos são ubíquos na natureza e são capazes de degradar os diversos tipos de hidrocarbonetos de cadeia curta, cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. (ROSENBERG, 1993).

O uso de substratos baratos ou subtilizados pode diminuir drasticamente o custo da produção de biossurfactantes. A escolha de uma matéria prima barata é importante para a economia global por representar 50% do custo da produção final e por reduzirem consideravelmente as despesas no tratamento residual (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999). Uma variedade de subprodutos incluindo derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas têm sido utilizado na produção de uma grande quantidade de metabólitos microbianos. Além de esses substratos potencializarem a produção de biossurfactantes, estes se tornam uma via para reduzir problemas ambientais devido ao descarte e ao custo no tratamento.

A seleção do substrato depende da escolha de um resíduo com um determinado balanço de nutrientes para o crescimento do micro-organismo e produção do biossurfactante. Os resíduos industriais com elevado teor de carboidratos ou lipídios são elementos necessários para serem usados como substratos para sua produção. Uma das estratégias usadas para estimular a produção de biossurfactantes é a modificação do meio nutricional (CALVO et al., 2009).

Resíduos orgânicos e industriais foram apontados como possíveis substratos para a produção de biossurfactantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Micro-organismos que degradam hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos no solo e em ambientes aquáticos. Populações desses micro-organismos normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando hidrocarbonetos estão presentes, essas populações aumentam até em 10% da comunidade (ATLAS, 1995).

3.4.1 Sacarose

A sacarose é um glicídio formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, é o açúcar comercial comum e está amplamente distribuído entre as plantas superiores, encontra-se na cana de açúcar de 15 a 20% e na beterraba de 14 a 18%. Sacarose é um substrato utilizado como padrão para a produção de biossurfactantes. Dados da literatura

relatam alta produtividade quando na presença de sacarose no meio de cultura. Batista e colaboradores (2006) isolaram e caracterizaram bactérias produtoras de surfactantes/bioemulssificantes, coletadas de ambientes marinhos e terrestres contaminados com óleos residuais ou seus subprodutos, estas amostras foram avaliadas quanto à fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose e querosene), sendo a sacarose a fonte que se apresentou mais eficiente na produção de biossurfactante.

Shavandi e colaboradores (2011) avaliaram o potencial de crescimento e de produção de biossurfactante pela bactéria *Rhodococcus* sp. com diferentes fontes de carbono incluindo a sacarose, a maior biomassa e ótima redução da tensão superficial foi obtida quando utilizado o substrato sacarose como única fonte de carbono. Khopade e colaboradores (2012) também verificaram melhor produção de biossurfactante quando usado a sacarose como fonte de carbono por *Streptomyces* marinho espécies B3, este resultado foi melhor que o meio de cultivo contendo glicerol.

3.4.2 Melaço

O melaço é resultante da etapa de centrifugação ou de decantação no processo de fabricação de açúcar, tanto de cana-de-açúcar como de beterraba. Contém açúcares redutores e parte de sacarose não cristalizada e outros açúcares de cadeias orgânicas mais complexas de difícil degradação, tais açúcares são assimiláveis (fermentáveis). O melaço é utilizado na fermentação para produção de álcool, em especial o etanol, como matéria prima pra fabricar cachaça, rum e fermentos biológicos. Portanto é uma alternativa interessante para a produção de biossurfactantes, devido ao seu baixo custo comparado com outras fontes de açúcar, e ao fato de que apresenta muitos outros compostos ricos em carbono, além da sacarose. Compostos minerais, compostos orgânicos e vitaminas que são valiosos para o processo de fermentação (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; PATEL; DESAI, 1997).

Patel e Desai (1997) usaram melaço como fonte de carbono e nitrogênio para produzir um biossurfactante ramnolipídico por *Pseudomonas aeruginosa* GS3, e obtiveram uma ótima produção desta molécula. Aparna e colaboradores (2012) verificaram a máxima produção de biossurfactante (4,97 g/L) quando foi usado o substrato melaço como fonte de carbono por *Pseudomonas* sp. 2B.

Bacillus subtilis MTCC (*Microbial Type Culture Collection*) 2423 e *Bacillus subtilis* MTCC 1427 foram cultivados utilizando melaço (2% de açúcares totais) como fonte de carbono. Como resultado da acumulação de biossurfactante, a tensão superficial do meio foi reduzida. Além disso, a recuperação de um solo contaminado com óleo foi de 34% para MTCC 1427 e 38,46% para MTCC 2423, indicando o potencial de utilização desses biossurfactantes na recuperação de solos contaminados (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Em 2006a, Rodrigues e colaboradores, avaliaram o potencial de uso de um meio fermentável alternativo para a produção de biossurfactantes por *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus*. Os resultados obtidos demonstraram que um meio complementado com soro de queijo e melaço pode ser usado como uma alternativa barata e econômica para produção de biossurfactantes por bactérias probióticas. Em 2008, Joshi e colaboradores também comprovaram o potencial do melaço como substrato para produção de tenso-ativos naturais por bactérias do gênero *Bacillus.*

Nitschke e Pastore (2004) selecionaram micro-organismos para a produção desses biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais, dentre eles o melaço. O melaço tem sido utilizado também, além da produção de biossurfactante, como a principal matéria prima para a produção de pululana (LAZARIDOU et al., 2002); goma xantana (KALOGIANNIS et al., 2003) e alginato (SILVA, 2009).

3.4.3 Manipueira

A manipueira é um líquido de cor amarelada que sai da mandioca depois de prensada, durante a fabricação da farinha. As casas de farinha são à base da economia de muitas regiões do Brasil, mas também são responsáveis por boa parte da poluição produzida nessas áreas decorrente do despejo da manipueira nos rios e açudes que polui as águas, causando intoxicação nas pessoas, além da morte dos peixes e de outros animais. Segundo Del Bianchi (1998), a produção de farinha de mandioca gera entre 267 e 419 litros de manipueira para cada tonelada de raiz processada. Esse resíduo é poluente devido ao alto teor de matéria orgânica, que eleva a demanda química de oxigênio (DQO) podendo chegar a 100g DQO /L, é potencialmente tóxico devido à presença do glicosídeo cianogênico linamarina, que pode gerar 140mg/L de cianeto (BARANA, 2000).

A manipueira pode ser aproveitada de várias maneiras, substituindo agrotóxicos nas lavouras, como defensivo contra insetos e pragas, na produção de vinagre, na produção de tijolos e produção de sabão. Entretanto a manipueira é um resíduo rico em carboidratos, a maioria dos nutrientes presentes no resíduo da mandioca são açúcares e sais minerais o que faz deste resíduo muito atrativo para processos biotecnológicos (NITSCHKE; PASTORE, 2006). Dentre os processos biotecnológicos destaca-se a produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos (SANTOS et al., 1999; BARROS et al., 2007; COSTA et al., 2010).

3.4.4 Soro de queijo

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios obtido pela coagulação do leite e redução do pH. Ele contém mais da metade dos sólidos presentes no leite integral original, incluindo a maioria da lactose, minerais e vitaminas hidrossolúveis, sobretudo do grupo B e 20% das proteínas do leite (ORDÓÑEZ, 2005).

Em alguns grandes laticínios, o soro proveniente de alguns tipos de queijo, é utilizado em produtos como bebidas lácteas, misturas para bolo, ração animal, etc, mas somente em pequenas quantidades, devido ao teor elevado de sais minerais. O soro láctico representa um grande problema de poluição ambiental. No entanto é relatado como um bom substrato para a produção de biossurfactante, pois é composto de níveis elevados de lactose (75% da matéria seca), 12-14% de proteína, ácidos orgânicos e vitaminas (RODRIGUES et al., 2006b). Outros autores também relataram boa produção de biossurfactante por diversos micro-organismos quando usado o soro de queijo como fonte de carbono, evidenciando o potencial de uso deste resíduo para produção desta biomolécula (OTTO et al., 1999; JOSHI et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

Para a realização do trabalho foi utilizada a bactéria *Bacillus pumilus* 2487, obtida da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello"- Campinas, SP.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio de manutenção do micro-organismo

O meio de manutenção da bactéria *Bacillus pumilus* foi ágar nutriente previamente esterilizado em autoclave a 121ºC por 15 minutos cuja fórmula, em g/L, é: extrato de carne 3,0; peptona de carne 5,0 e ágar 15. Os tubos foram mantidos sob refrigeração a 4ºC.

4.2.2 Meio mínimo ou basal

O meio empregado para a fermentação foi o meio mínimo ou basal proposto por Bicca e colaboradores (1999). Este consta, em g/L, de: $NaNO_3$ 7,0; K_2HPO_4 1,0; KH_2PO_4 0,50; KCl 0,10; $MgSO_4.7H_2O$ 0,50; $CaCl_2$ 0,01; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01; extrato de levedura 0,10; óleo diesel 1% (v/v). O pH foi ajustado a 7,0 e o meio foi esterilizado à 121ºC por 15 minutos.

4.2.3 Preparo do substrato

A manipueira passou por um processo de fervura e após resfriamento o resíduo foi centrifugado à 7077 g por 15 minutos para a remoção dos sólidos insolúveis do material e o sobrenadante distribuído em frascos para esterilização em autoclave à 1 atm, 121°C por 15 minutos

O preparo do substrato soro de queijo foi realizado seguindo o modelo de Joshi e colaboradores (2008). O resíduo foi fervido por 10 minutos e após resfriamento centrifugado a 7077 g por 15 minutos. Em seguida o pH do sobrenadante foi ajustado à 4 com H_2SO_4 e fervido por 10 minutos; resfriado e o pH foi ajustado novamente à 7,0 com

NaOH. O precipitado foi removido por filtração em algodão, e o sobrenadante esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos para ser usado no processo de fermentação.

No melaço foi realizado um processo de clarificação, foram adicionadas claras de ovo ao substrato e submetido ao "vapor fluente" em autoclave, por 15 minutos, e em seguida filtrado com algodão e papel filtro (Whatman nº 1).

4.2.4 Meio de produção

Para a produção do biossurfactante, foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo o substrato a ser testado (previamente esterilizado): sacarose, melaço, manipueira e soro de queijo em concentrações predeterminadas acrescido do meio mínimo ou basal (item 4.2.2). As concentrações dos substratos, exceto sacarose, foram ajustadas utilizando um refratômetro para leitura da concentração de sólidos solúveis. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.3.1 Pré - fermentação

A bactéria *Bacillus pumilus* foi inoculada pela técnica esgotamento por estrias em tubos inclinados de ágar nutriente (previamente esterilizados) e incubada por 24 horas a 30ºC em estufa bacteriológica. Posteriormente, foi realizada uma suspensão bacteriana de cada tubo utilizando o meio mínimo com 3% de sacarose previamente estéril. A seguir, esta suspensão foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 mL totalizando 50 mL. Estes foram incubados a 30°C em agitador orbital rotatório com controle de temperatura por 24 horas e 200 rpm.

4.3.2 Preparo do inóculo

Para a produção do biossurfactante nas condições predeterminadas (4.4) foi realizada uma padronização da quantidade de inóculo a partir do caldo pré-fermentado. Este foi centrifugado à 7077 g por 15 minutos à 4ºC, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" de células foi re-suspendido em água destilada estéril. Em uma cubeta de espectrofotômetro (Bel photonics, modelo SP 1105) foram colocados 2 mL de água

destilada (branco) e adicionado o volume de células necessário para atingir um valor de 0,5 de absorbância no comprimento de onda de 620 nm, o qual correspondeu a 10^8 UFC/mL inicial. Por meio de uma regra de três foi calculado o volume necessário do inóculo a ser adicionado em cada frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de produção totalizando 50 mL do conteúdo final.

4.3.3 Fermentação

Cada frasco de Erlenmeyer contendo 50 mL (meio de produção e inóculo) foi incubado em agitador orbital rotatório com controle de temperatura, com concentração do substrato, temperatura, agitação e tempo de fermentação predeterminados pelo planejamento experimental (item 4.4).

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

Para a produção de biossurfactante utilizando os substratos (sacarose, melaço, manipueira e soro de queijo) foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. As variáveis independentes estudadas foram X_1: concentração do substrato (g/L), ou teor de sólidos solúveis (TSS); X_2: tempo de incubação (h); X_3: temperatura de incubação (ºC); X_4: agitação (rpm) (Tabela 2). Resultando em 27 experimentos com 2 repetições no ponto central (pc) para cada meio fermentativo (MONTGOMERY, 2001) (Tabela 3). As respostas analisadas foram tensão superficial; índice de emulsificação com tolueno; índice de emulsificação com óleo de soja; crescimento microbiano.

Tabela 2 - Variáveis independentes, estudadas no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, para cada substrato testado.

Variáveis	**Níveis**		
	-1	0	1
X_1: Concentração do substrato (g/L ou TSS)	1	3	5
X_2: Tempo de incubação (h)	24	60	96
X_3:Temperatura de incubação (ºC)	30	37,5	45
X_4: Agitação (rpm)	100	150	200

Tabela 3. Delineamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} para os substratos: Sacarose, melaço, manipueira e soro de queijo.

Experimento	Replicata	Substrato (g/L)	Tempo (h)	Temperatura (ºC)	Agitação (rpm)
1	1	1,0	24,0	30,0	100
2	1	5,0	24,0	30,0	200
3	1	1,0	96,0	30,0	200
4	1	5,0	96,0	30,0	100
5	1	1,0	24,0	45,0	200
6	1	5,0	24,0	45,0	100
7	1	1,0	96,0	45,0	100
8	1	5,0	96,0	45,0	200
9 (C)	1	3,0	60,0	37,5	150
10	2	1,0	24,0	30,0	100
11	2	5,0	24,0	30,0	200
12	2	1,0	96,0	30,0	200
13	2	5,0	96,0	30,0	100
14	2	1,0	24,0	45,0	200
15	2	5,0	24,0	45,0	100
16	2	1,0	96,0	45,0	100
17	2	5,0	96,0	45,0	200
18 (C)	2	3,0	60,0	37,5	150
19	3	1,0	24,0	30,0	100
20	3	5,0	24,0	30,0	200
21	3	1,0	96,0	30,0	200
22	3	5,0	96,0	30,0	100
23	3	1,0	24,0	45,0	200
24	3	5,0	24,0	45,0	100
25	3	1,0	96,0	45,0	100
26	3	5,0	96,0	45,0	200
27 (C)	3	3,0	60,0	37,5	150

(C): ponto central.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Determinação do crescimento microbiano

Após cada período de fermentação (item 4.4) foi realizada uma diluição seriada do caldo de cultivo em água destilada estéril e realizado o plaqueamento por superfície em ágar nutriente. Foi determinada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

após um período de 24 horas de incubação à 30ºC. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Determinação da presença de biossurfactante

Após cada tempo de fermentação (item 4.4) os caldos fermentados foram centrifugados (centrífuga - Jouan, modelo GR 2022) a 7077g por 15 minutos a 4ºC para separação de células do sobrenadante (Figura 5). A determinação da presença de biossurfactante foi realizada pelas análises de tensão superficial e índice de emulsificação no sobrenadante.

Figura 5. (a) Fotografia da centrífuga com tubos contendo 50 mL do caldo de fermentação; (b) Fotografia da separação das células (“pellet”) do sobrenadante.



(a)



(b)

4.5.3 Determinação do pH final

O pH foi determinado diretamente no caldo fermentado livre de células por potenciometria, após cada período de fermentação.

4.5.4 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada medindo-se diretamente um volume de 10 mL do caldo de fermentação livre de células em um tensiômetro de Leconde Du Nouy, na temperatura de 25ºC.

4.5.5 Índice de emulsificação – tolueno/ óleo de soja

Foram determinados índices de emulsificação com o hidrocarboneto tolueno e com óleo de soja. O índice de emulsificação foi avaliado por meio da adição de 2 mL de tolueno/óleo de soja em tubos de ensaio 100 x 15 mm com 2 mL do caldo de cultivo livre de células obtido após a centrifugação. Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex durante 2 minutos. Em seguida foi realizada a leitura após 24 horas de repouso. O índice de emulsificação foi calculado segundo Iqbal e colaboradores (1995):
IE_{24}= (altura da camada de emulsão (mm) / altura total da coluna (mm)) x100.

4.6 PARÂMETROS SELECIONADOS

Foram verificados os melhores parâmetros de produção de biossurfactante para cada substrato a partir dos melhores resultados de tensão superficial e de índice de emulsificação.

4.6.1 Determinação da diluição micelar crítica (CMD)

Alíquotas de 0,1 mL dos meios de cultura centrifugados foram diluídas 10 vezes (CMD^{-1}) e 100 vezes (CMD^{-2}) em água destilada, a seguir as tensões superficiais das respectivas diluições foram determinadas conforme o item 4.5.4.

4.6.2 Estudos de estabilidade

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada frente às condições extremas de pH, temperatura e salinidade.

4.6.2.1 Estabilidade frente à temperatura

O meio de cultivo livre de células foi colocado em uma série de tubos de ensaio (10 mL) e submetido a uma temperatura de 100°C por períodos de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos (KHOPADE et al., 2012). O mesmo procedimento foi realizado com os caldos de CMD^{-1} e CMD^{-2}. Após o tratamento térmico, cada solução foi resfriada até temperatura ambiente para medição da tensão superficial. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

4.6.2.2 Estabilidade frente à força iônica

O meio de cultivo livre de células foi colocado em uma série de tubos de ensaio (10 mL) e adicionadas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20% de NaCl. O mesmo procedimento foi realizado com os caldos de CMD^{-1} e CMD^{-2}. A estabilidade foi avaliada por meio da determinação da tensão superficial. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.2.3 Estabilidade frente à pH

O pH do meio livre de células foi ajustado utilizando as soluções NaOH ou HCl para 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 (JOSHI et al., 2008). O mesmo procedimento foi realizado com os caldos de CMD^{-1} e CMD^{-2}. O efeito do pH foi avaliado por meio da medição da tensão superficial. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.6.3 Concentração bruta de biossurfactante

Uma alíquota do meio de cultivo livre de células foi adicionada de HCl 6N até atingir o pH 2,0 e mantida em repouso por 24 horas a 4ºC. Foi realizada uma centrifugação à 7077 g por 15 minutos à 4ºC para separação do precipitado. O precipitado foi ressuspendido em água e colocado em frascos previamente pesados, levados à estufa de 55ºC até peso constante. O biossurfactante assim obtido foi calculado em g/L, sendo que, todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.4 Produção em escala ampliada

A produção de biossurfactante em escala ampliada foi realizada no laboratório de xenobióticos do Departamento de Biotecnologia e Bioengenharia do Centro de Investigação e Estudos Avançados do Instituto Politécnico Nacional (México, D.F).

A pré-fermentação e o preparo do inóculo foram realizados seguindo os itens 4.3.1 e 4.3.2. A fermentação em escala ampliada foi realizada utilizando um fermentador (Sartorius, modelo Biostat B) de capacidade de 3,0 L contendo 2,0 L do meio de produção.

O substrato utilizado foi sacarose a 1%, as condições de fermentação foram temperatura de 30ºC a 200 rpm, taxa de oxigênio dissolvido no meio de cultivo entre 10 e 20% e pH de 7 controlados pelo fermentador. Foi verificada a produção por 24, 48, 72 e 96 horas a fim de identificar o melhor tempo para produção e posterior aplicação no solo. No caldo de cultivo livre de células foram realizadas as análises de crescimento microbiano, tensão superficial e índice de emulsificação (itens: 4.5.1; 4.5.4; 4.5.5).

Após as determinações das propriedades tenso-ativas, foi escolhido o melhor tempo de fermentação para aplicação em biorremediação de solo, verificação da produção bruta de biossurfactante (item 4.6.3) e concentração micelar crítica (CMC).

A CMC foi determinada através de diluições em água destilada do biopolímero seco até peso constante, e posterior medição da absorbância em espectrofotômetro a 240 nm. O comprimento de onda foi determinado por meio de um varrido prévio de 200-600 nm (em espectrofotômetro) com o biossurfactante bruto diluído em água destilada (2 g/L).

4.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO

Todas as análises foram realizadas no laboratório de xenobióticos do Departamento de Biotecnologia e Bioengenharia do Centro de Investigação e Estudos Avançados do Instituto Politécnico Nacional (México, D.F).

4.7.1 Amostra de solo

Para a biorremediação foi utilizado um solo agrícola do Estado de Puebla no México contaminado com petróleo de um oleoduto no ano de 2010. A amostragem foi realizada aleatoriamente.

4.7.2 Textura do solo

50 gramas de solo foram misturadas com 15 mL de peróxido de hidrogênio a 10% (H_2O_2); a mistura foi seca à 80ºC por 24 horas. Depois de seca foram agregados 5 mL de solução de metassilicato de sódio a 5% (Na_2SiO_3) e 5 mL de solução de oxalato de sódio a 5% ($Na_2C_2O_4$). A mistura foi aforada a 1000 mL com água destilada, agitada por 1 minuto e mantida em repouso por 40 segundos para a leitura com hidrômetro e medição da temperatura. As mesmas medições foram realizadas após 2 horas (BOUYOUCOS, 1927).
A classificação do solo é dada de acordo com os cálculos:
% de silte + % de argilas = (1ª leitura / g de solo) * 100
% de areia = 100 – (% de silte + % de argilas)
% argila = (2ª leitura / g de solo) * 100
% de silte = (% de silte + % de argilas) - % de argilas

Com base nas porcentagens obtidas, a classificação foi dada de acordo com o triângulo de texturas.

4.7.3 Determinação de nitrogênio total (Método kjeldalh)

Em tubos de Kjeldahl foram adicionadas 2 gramas de uma mistura catalisadora (K_2SO_4 + HgO) e 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 0,5 gramas de solo. A mistura foi aquecida no bloco digestor com extração dos vapores até clarificação. Após 2 horas, o resíduo foi dissolvido em pouca quantidade de água destilada e transferido ao tubo de destilador e adicionado 120 mL de NaOH 32%. Em um Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 5 mL de ácido bórico 5% (H_3BO_3) e 2 gotas do indicador vermelho de metila 2%. Ocorreu a destilação por arraste de vapor coletando 75 mL no frasco de Erlenmeyer. Após a destilação foi realizado uma titulação com HCl 0,01 N. (MUÑOZ-INIESTRA et al., 2000).

Foi realizado o seguinte cálculo utilizando a equação 1:

$$\%N = \left(\frac{(V_2 - V_1) \times 14.007 \times N}{m} \right) \times 100 \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

V_2 = Volume de HCl gasto na amostra (ml)

V_1 = Volume de HCl gasto no branco (ml)

N = Normalidade do HCl (meq/ml)

m = Massa da amostra (mg)

4.7.4 Determinação de fósforo total

Esta análise foi realizada de acordo com a norma ambiental mexicana: MÉXICO, Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Em 1 grama de solo foram adicionados 7 mL de solução extratora (460 mL de água destilada, 15 mL de NH_4F, e 25 mL de HCl 0,5 N) agitado e filtrado em membrana de celulose 0,4 μm. Posteriormente, 1 mL do filtrado foi adicionado a 6 mL de água destilada e 2 mL de molibdato de amônio ($(NH_4)6Mo_7O_{24}$). Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de cloreto de estanho diluída ($SnCl_2$) e realizada a leitura a 640nm depois de 10 minutos. O branco foi feito com 2 mL de solução extratora, 5 mL de água destilada e 2 mL de molibdato de amônio misturados, e adicionado 1 mL de solução cloreto de estanho.

4.7.5 Determinação da matéria orgânica

0,5 gramas da amostra foram adicionadas com 5 mL de dicromato de potássio (K2Cr2O7) e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). A mistura ficou em repouso por 30 minutos e foram agregados 100 mL de água destilada e 5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e agitados por 1 minuto. Acrescentaram-se 5 gotas de difenilamina e foi titulado com sulfato de ferro ($FeSO_4$) 0,5 N. (MUÑOZ-INIESTRA et al., 2000).

O cálculo para matéria orgânica foi realizado utilizando a equação 2:

$$\%MO = \left(\frac{5 - \left(\frac{V_2 \times 10 \times N_{FeSO4}}{V_1} \right)}{m} \right) \times 0.69$$

(equação 2)

Onde:

V_1 = Gasto de $FeSO_4$ no branco (ml)

V_2 = Gasto de $FeSO_4$ na amostra (ml)

N_{FeSO4} = Normalidade do FeSO4

m = Massa da amostra (g)

0.69 = Fator de conversão de carbono orgânico a matéria orgânica

4.7.6 Determinação da capacidade de campo

Foram colocados 5 gramas de solo em um filtro de papel previamente pesado e agregado água até a total saturação do solo. Em seguida, foram mantidas em repouso até não se observar drenagem da água e então, o filtro foi novamente pesado e foi realizado o seguinte cálculo utilizando a equação 3.

%C.C = (peso do filtro com o solo úmido – peso do filtro com solo seco) / (peso do filtro com solo seco – peso do filtro) x 100.

4.7.7 pH do solo

Foi realizada uma diluição do solo 1:10 (peso/volume), centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante mensurado por potenciometria.

4.8 BIORREMEDIAÇÃO

Para biorremediar o solo contaminado com hidrocarbonetos foi utilizado o caldo de cultivo livre de células produzido na fermentação em escala ampliada. Foram criados sistemas fechados em frascos com 30 gramas de solo também chamados de microcosmos.

Foi calculada a quantidade necessária de caldo a ser adicionado no solo para obtenção das capacidades de campo de 30% e 50% finais.

Foi realizado um ajuste no solo da concentração de carbono, nitrogênio e fósforo (C:N:P) para a proporção de 100:10:1 (COOKSON, 1995). Para verificar a influência na biorremediação da concentração micelar crítica do biossurfactante (g/L) e da mistura de areia junto ao solo durante 7 e 21 dias. Para tal, foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^2 (Tabela 4).

O mesmo planejamento estatístico e análises foram realizados com um surfactante sintético, o tergitol NP-10 (marca Sigma-Aldrich), em sua CMC e acima desta (55mg/L e 110mg/L), para comparação com surfactante biológico. A tensão superficial dessa molécula é de 33 mNm^{-1}.

Foram realizados os seguintes controles: solo + 2% de areia; solo + 4% de areia; solo sem areia e solo puro sem água, nas capacidades de campo de 30% e 50% com a substituição de caldo de cultivo por água.

Tabela 4. Delineamento experimental fatorial fracionado 2^2.

Experimentos	% de areia	CMC (g/L)
1	2,0	0,9
2	2,0	0,9
3	4,0	0,9
4	4,0	1,8
5	4,0	1,8
6	2,0	1,8
7	4,0	0,9
8	2,0	1,8

4.8.1 Determinação do CO_2

Nas primeiras 24 horas e a cada 3 dias foi verificada a concentração de CO_2 presente nos sistemas por meio de cromatografia gasosa (Gow Mac, modelo SERIES 580), coluna concêntrica empacotada ALLTECH CTR 8700 que permite a quantificação simultânea de O_2, N_2 e CO_2. O gás utilizado foi o hélio a um fluxo em linha A de 55,02 mL/min e linha B de 30 mL/min. Condições do equipamento: injetor 40ºC, detector 100ºC, corrente 125 mA, coluna a temperatura ambiente (25ºC) e corrida de 4 minutos. O volume

injetado de amostra foi de 2 mL. Os tempos de retenção e a área sob a curva mediram-se por meio de um integrador de áreas.

Após a medição de CO_2 foi realizada a aeração dos microcosmos por sistemas de agulhas, por 20 minutos e pesagem para verificar a umidade constante.

4.8.2 Determinação dos hidrocarbonetos de fração pesada (HFP)

As análises foram realizadas de acordo com a norma mexicana: MÉXICO. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Frascos foram preparados até peso constante em estufa (100ºC durante 2 horas) e mantidos em dessecador. Em um almofariz, 4 gramas do solo foram misturadas com 12 gramas de sulfato de sódio (Na_2SO_4) até obter-se um pó uniforme. Esta mistura foi transferida para um tubo de extração em sistema de forno microondas (Mars Xpress) e adicionados 25 mL de hexano. Depois de submetido ao programa de aquecimento (110ºC por 5 minutos), foi invertida somente a fase liquida em frasco contendo 5 gramas de sílica e agitado por 5 minutos. Essa mistura foi diretamente filtrada em papel de filtro (Whatman nº 1) nos frascos com peso constante. Depois da sílica seca, os frascos foram submetidos ao rotaevaporador (65ºC) e foram novamente secos em estufa a 100ºC por 10 minutos e pesados. A fração pesada é determinada por gravimetria.

4.8.3 Determinação dos hidrocarbonetos de fração média (HFM)

As análises foram realizadas de acordo com a norma mexicana: MÉXICO. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Em um almofariz, 4 gramas do solo foram misturadas com 12 gramas de sulfato de sódio (Na_2SO_4) até obter-se um pó uniforme. Esta mistura foi transferida para um tubo de extração em sistema de forno microondas (Mars Xpress) e adicionados 25 mL de diclorometano-acetona (1:1). Depois de submetido ao programa de aquecimento (110ºC por 5 minutos), somente a fase líquida foi submetida a rotaevaporação a 50ºC. Após a rotaevaporação os frascos foram lavados com diclorometano e este foi aforado a 2 mL. O hidrocarboneto de fração média foi analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/IF). Foram injetados 1 μL da amostra.

O cromatógrafo utilizado foi o Thermo Scientific modelo GC Focus Series, coluna capilar de 30 m (GRACE) de longitude por 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de camada grossa, como gás de arraste usado foi o nitrogênio com fluxo de 1,3 mL/min e como gás auxiliar foi empregado o hidrogênio. Condições do equipamento: injetor 250ºC, detector 250ºC e coluna 50-270ºC. O padrão utilizado para as medições de hidrocarbonetos foi uma mistura de n-alcanos (C_{10}-C_{28}).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CRESCIMENTO MICROBIANO

Com base nos estudos da análise de variância (ANOVA) pelo software *Statistica* 7.0, observou-se no planejamento estatístico fatorial fracionado 2^{4-1} que o crescimento da bactéria *Bacillus pumilus* utilizando como fonte de carbono os substratos manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose demonstrou ser diferente em cada substrato testado.

Utilizando o substrato manipueira todas as variáveis apresentaram influências significativas estatisticamente ($p < 0,05$) para o crescimento microbiano (Tabela 5), sendo as condições ideais encontradas na maior concentração (5%) e agitação (200 rpm), menor tempo (24 horas) e temperatura (30ºC) (Figura 6). Nesta condição, houve crescimento microbiano (10^9) em relação ao inóculo inicial (10^8), porém, na temperatura de 45ºC foi observada uma redução do número de células (10^7).

Variáveis como temperatura de fermentação e concentração do substrato são fatores críticos para produção e propriedades de um biossurfactante. Utilizando a bactéria *Bacillus mycoides*, Najafi e colaboradores (2010) também verificaram que quanto maior a concentração do substrato e menor a temperatura de fermentação melhor é o crescimento microbiano no meio de cultivo.

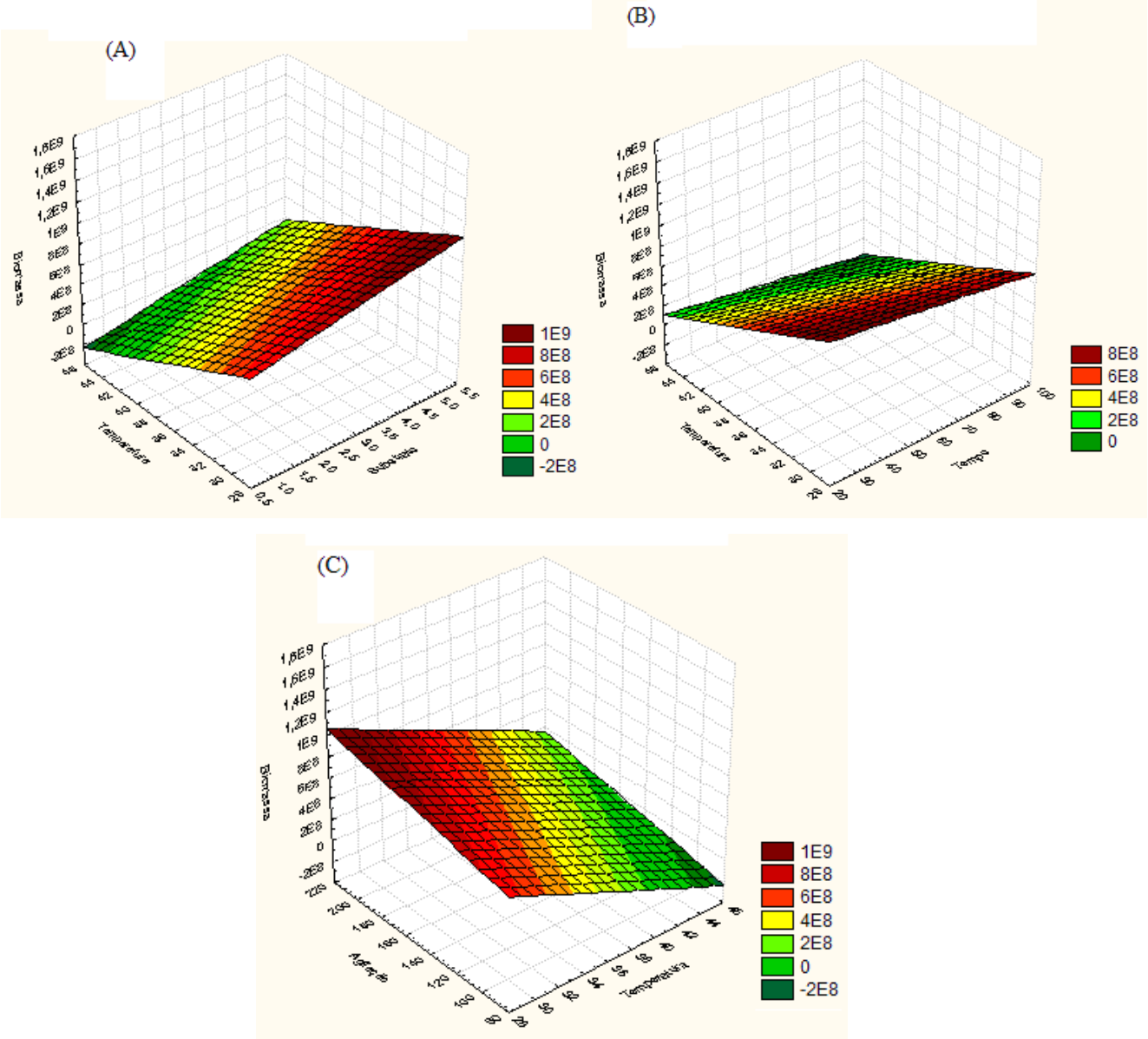
Da mesma forma como observado no presente trabalho, Nitschke e Pastore (2006), verificaram melhor crescimento microbiano em tempo menor de fermentação utilizando manipueira como substrato pela bactéria *Bacillus subtilis*. Recentemente, a bactéria *Bacillus pumilus* foi relatada como produtora de surfactina em fermentação sólida apresentando alto nível de produção quando incubada em temperaturas menores também foi observado que o crescimento microbiano está diretamente relacionado com a produção do biopolímero (SLIVINSKI et al., 2012).

Tabela 5. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato manipueira, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$).

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	C.M $*X_{1,2,3,4}$	T.S $*X_2$	I.E t $*X_3$	I.E o $*X_1$
1	1,0	24,0	30,0	100	$4,2x10^8$	49	0,0	30,0
2	5,0	24,0	30,0	200	$1,6x10^9$	46	10,0	40,0
3	1,0	96,0	30,0	200	$4,8x10^8$	50	33,3	36,6
4	5,0	96,0	30,0	100	$5,5x10^8$	51	0,0	36,6
5	1,0	24,0	45,0	200	$2,5x10^7$	51	0,0	23,3
6	5,0	24,0	45,0	100	$1,0x10^7$	48	43,3	43,3
7	1,0	96,0	45,0	100	$4,0x10^7$	50	33,3	23,3
8	5,0	96,0	45,0	200	$1,9x10^7$	52	36,6	33,3
9 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$2,9x10^8$	49	0,0	16,6
10	1,0	24,0	30,0	100	$3,7x10^8$	50	0,0	36,6
11	5,0	24,0	30,0	200	$1,6x10^9$	47	10,0	40,0
12	1,0	96,0	30,0	200	$4,7x10^8$	50	36,6	33,3
13	5,0	96,0	30,0	100	$5,3x10^8$	52	0,0	33,3
14	1,0	24,0	45,0	200	$2,7x10^7$	52	0,0	26,6
15	5,0	24,0	45,0	100	$1,2x10^7$	48	50,0	50,0
16	1,0	96,0	45,0	100	$4,1x10^7$	48	26,6	23,3
17	5,0	96,0	45,0	200	$2,0x10^7$	50	26,6	43,3
18 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$3,1x10^8$	49	0,0	16,6
19	1,0	24,0	30,0	100	$4,0x10^8$	49	0,0	36,6
20	5,0	24,0	30,0	200	$1,6x10^9$	46	10,0	36,6
21	1,0	96,0	30,0	200	$4,5x10^8$	51	33,3	33,3
22	5,0	96,0	30,0	100	$5,6x10^8$	52	0,0	33,3
23	1,0	24,0	45,0	200	$2,6x10^7$	50	0,0	23,3
24	5,0	24,0	45,0	100	$1,2x10^7$	48	40,0	40,0
25	1,0	96,0	45,0	100	$4,0x10^7$	48	36,6	33,3
26	5,0	96,0	45,0	200	$1,9x10^7$	51	30,0	40,0
27 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$3,1x10^8$	49	0,0	16,6

* Variáveis independentes estatisticamente significativas. ** Nenhuma.
(C): ponto central.
x_1: concentração de manipueira (g/L); x_2: tempo (h); x_3: temperatura (°C); x_4: agitação (rpm); C.M: crescimento microbiano; T.S: tensão superficial; I.Et: índice de emulsificação com tolueno; I.Eo: índice e emulsificação com óleo de soja.

Figura 6. Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e concentração do substrato (g/L) (equação: 1,9839E9+8,0069E7*x-4,9104E7*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 2,4312E9-3,4522E6*x-4,9104E7*y); (C) biomassa ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 1,7927E9-4,9104E7*x+2,8761E6*y).



Quando utilizado melaço como fonte de carbono, estatisticamente ($p<0,05$) não houve interferência significativa de nenhuma das variáveis testadas (Tabela 6). Analisando a Figura 7, verifica-se que resultado similar ao substrato manipueira foi encontrado. Isto é, o maior crescimento microbiano foi observado em menor temperatura e maior agitação. Foi verificada viabilidade celular em todas as condições testadas. Houve para cada

concentração do substrato um crescimento celular diferente, conseqüentemente podendo afetar a produção de biossurfactante. Este mesmo resultado foi encontrado por Souza Sobrinho e colaboradores (2008) utilizando a levedura *Candida sphaerica* com resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

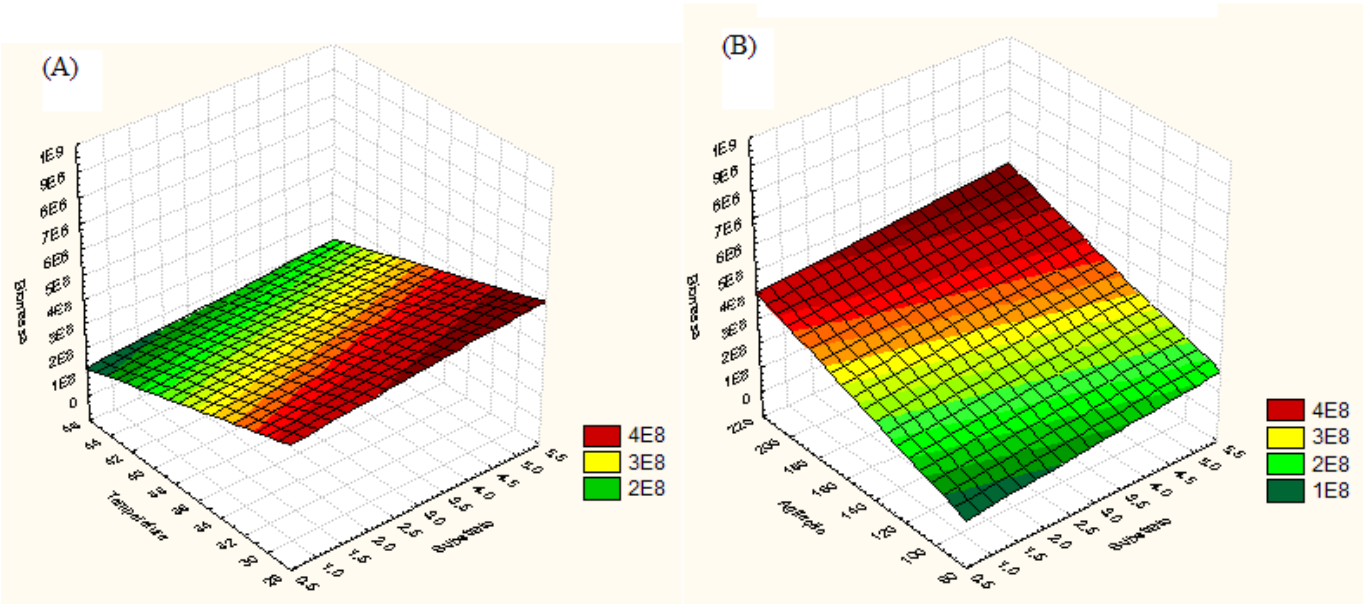
Tabela 6. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato melaço, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$).

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	C.M	T.S	I.E t	I.E o
					**	$*X_{2,3,4}$	$*X_{1,2,3,4}$	$*X_{1,2}$
1	1,0	24,0	30,0	100	$6,0x10^7$	37	0,0	30,0
2	5,0	24,0	30,0	200	$6,7x10^8$	45	10,0	30,0
3	1,0	96,0	30,0	200	$9,0x10^8$	46	0,0	40,0
4	5,0	96,0	30,0	100	$1,2x10^8$	40	33,3	26,6
5	1,0	24,0	45,0	200	$1,2x10^8$	46	23,3	26,6
6	5,0	24,0	45,0	100	$6,0x10^8$	48	26,6	30,0
7	1,0	96,0	45,0	100	$3,6x10^7$	49	43,3	36,6
8	5,0	96,0	45,0	200	$3,4x10^7$	48	33,3	33,3
9 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$1,2x10^8$	47	30,0	26,6
10	1,0	24,0	30,0	100	$6,0x10^7$	38	0,0	40,0
11	5,0	24,0	30,0	200	$6,5x10^8$	44	13,3	26,6
12	1,0	96,0	30,0	200	$8,9x10^8$	47	0,0	40,0
13	5,0	96,0	30,0	100	$1,1x10^8$	41	33,3	33,3
14	1,0	24,0	45,0	200	$1,3x10^8$	46	16,6	33,3
15	5,0	24,0	45,0	100	$6,0x10^8$	48	23,3	30,0
16	1,0	96,0	45,0	100	$3,2x10^7$	49	40,0	50,0
17	5,0	96,0	45,0	200	$3,2x10^7$	48	33,3	23,3
18 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$1,2x10^8$	46	33,3	33,3
19	1,0	24,0	30,0	100	$5,0x10^7$	35	0,0	33,3
20	5,0	24,0	30,0	200	$6,4x10^8$	44	10,0	30,0
21	1,0	96,0	30,0	200	$9,0x10^8$	47	0,0	40,0
22	5,0	96,0	30,0	100	$1,2x10^8$	43	40,0	30,0
23	1,0	24,0	45,0	200	$1,4x10^8$	47	20,0	33,3
24	5,0	24,0	45,0	100	$6,1x10^8$	49	23,3	26,6
25	1,0	96,0	45,0	100	$3,3x10^7$	48	36,6	40,0
26	5,0	96,0	45,0	200	$3,3x10^7$	47	33,3	26,6
27 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$1,3x10^8$	46	33,3	33,3

* Variáveis independentes estatisticamente significativas. ** Nenhuma.

(C): ponto central. x_1: concentração de melaço (g/L); x_2: tempo (h); x_3: temperatura (°C); x_4: agitação (rpm); C.M: crescimento microbiano; T.S: tensão superficial; I.Et: índice de emulsificação com tolueno; I.Eo: índice e emulsificação com óleo de soja.

Figura 7. Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e concentração do substrato (g/L) (equação: 8,1842E8+1,8167E7*x-1,5411E7*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e concentração do substrato (g/L) (equação: -9,75E7+1,8167E7*x+2,2533E6*y).



Nas fermentações utilizando o substrato soro de queijo foi observado estatisticamente ($p<0,05$) influência de todos os parâmetros testados (Tabela 7). A melhor condição onde foi observado maior número de células viáveis foi encontrada quando utilizado o menor tempo de fermentação (24 horas), na menor temperatura (30ºC), maior concentração do substrato (5%) e maior agitação do meio de cultivo (200 rpm) (Figura 8), mantendo-se viáveis aproximadamente 10^8 células do inóculo inicial. Por outro lado de forma oposta ao encontrado neste trabalho, Rodrigues e colaboradores (2006b), utilizando *Lactobacillus pentosus* com soro de queijo como substrato verificaram baixo crescimento nas primeiras 72 horas, porém observaram produção de biossurfactante similar a um meio sintético testado.

Quando observado o crescimento da bactéria *Bacillus pumilus* utilizando como fonte de carbono a sacarose; as variáveis tempo, temperatura e agitação ($p<0,05$) (Tabela 8), foi verificado que a concentração do substrato não influenciou estatisticamente no crescimento microbiano (Figura 9). Entretanto, de acordo com Najafi e colaboradores (2010) cada bactéria possui um limite para a concentração da fonte de carbono no meio; sendo assim, a bactéria *Bacillus pumilus* pode crescer de forma diferente em cada concentração do substrato testado como observado.

De um modo geral, para todos os substratos foi verificado que a temperatura de fermentação é um fator importante para o crescimento e viabilidade da bactéria *Bacillus pumilus*. A menor temperatura testada (30ºC) foi melhor para manter as células viáveis, e a maior (45ºC) promoveu a morte celular.

Tabela 7. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato soro de queijo, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$).

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	C.M $*X_{1,2,3,4}$	T.S $*X_3$	I.E t $*X_1$	I.E o **
1	1,0	24,0	30,0	100	$4,6x10^7$	47	40,0	33,3
2	5,0	24,0	30,0	200	$7,5x10^8$	50	16,6	33,3
3	1,0	96,0	30,0	200	$1,5x10^8$	50	23,3	33,3
4	5,0	96,0	30,0	100	$5,2x10^7$	46	0,0	40,0
5	1,0	24,0	45,0	200	$1,7x10^8$	48	40,0	40,0
6	5,0	24,0	45,0	100	$1,5x10^8$	49	3,3	33,3
7	1,0	96,0	45,0	100	$2,9x10^7$	52	46,6	33,3
8	5,0	96,0	45,0	200	$3,2x10^7$	50	0,0	33,3
9 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$2,0x10^8$	47	0,0	33,3
10	1,0	24,0	30,0	100	$4,5x10^7$	47	40,0	33,3
11	5,0	24,0	30,0	200	$7,5x10^8$	50	16,6	33,3
12	1,0	96,0	30,0	200	$1,4x10^8$	50	23,3	30,0
13	5,0	96,0	30,0	100	$5,0x10^7$	46	0,0	43,3
14	1,0	24,0	45,0	200	$1,9x10^8$	48	40,0	40,0
15	5,0	24,0	45,0	100	$1,5x10^8$	49	3,3	33,3
16	1,0	96,0	45,0	100	$2,6x10^7$	51	46,6	33,3
17	5,0	96,0	45,0	200	$3,0x10^7$	49	0,0	36,6
18 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$1,9x10^8$	48	0,0	33,3
19	1,0	24,0	30,0	100	$4,6x10^7$	47	40,0	36,6
20	5,0	24,0	30,0	200	$7,5x10^8$	49	16,6	33,3
21	1,0	96,0	30,0	200	$1,4x10^8$	50	26,6	30,0
22	5,0	96,0	30,0	100	$4,9x10^7$	46	0,0	40,0
23	1,0	24,0	45,0	200	$1,8x10^8$	48	43,3	40,0
24	5,0	24,0	45,0	100	$1,5x10^8$	50	3,3	33,3
25	1,0	96,0	45,0	100	$2,7x10^7$	53	46,6	33,3
26	5,0	96,0	45,0	200	$3,4x10^7$	49	0,0	36,6
27 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$2,0x10^8$	49	0,0	33,3

* Variáveis independentes estatisticamente significativas. ** Nenhuma.
(C): ponto central.
x_1: concentração de soro de queijo (g/L); x_2: tempo (h); x_3: temperatura (°C); x_4: agitação (rpm); C.M: crescimento microbiano; T.S: tensão superficial; I.Et: índice de emulsificação com tolueno; I.Eo: índice e emulsificação com óleo de soja.

Figura 8. Superfícies de resposta utilizando soro de queijo como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e concentração do substrato (g/L) (equação: 2,4676E8+3,6625E7*x+2,08E6*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 7,3192E8-3,0301E6*x-1E7*y).

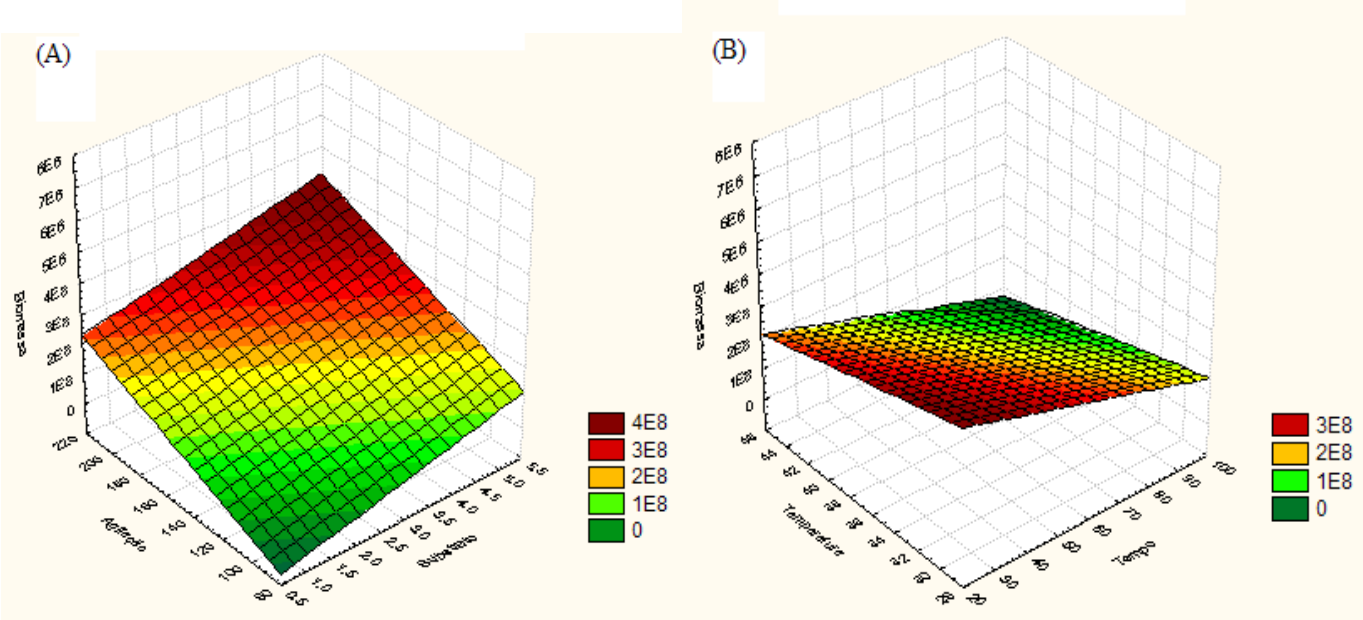


Figura 9. Superfícies de resposta utilizando sacarose como substrato para (A) biomassa (UFC/mL), ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 7,7304E8+1,4063E7*x-1,8028E7*y); (B) biomassa (UFC/mL) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 6,0635E8-1,8028E7*x+1,3925E6*y).

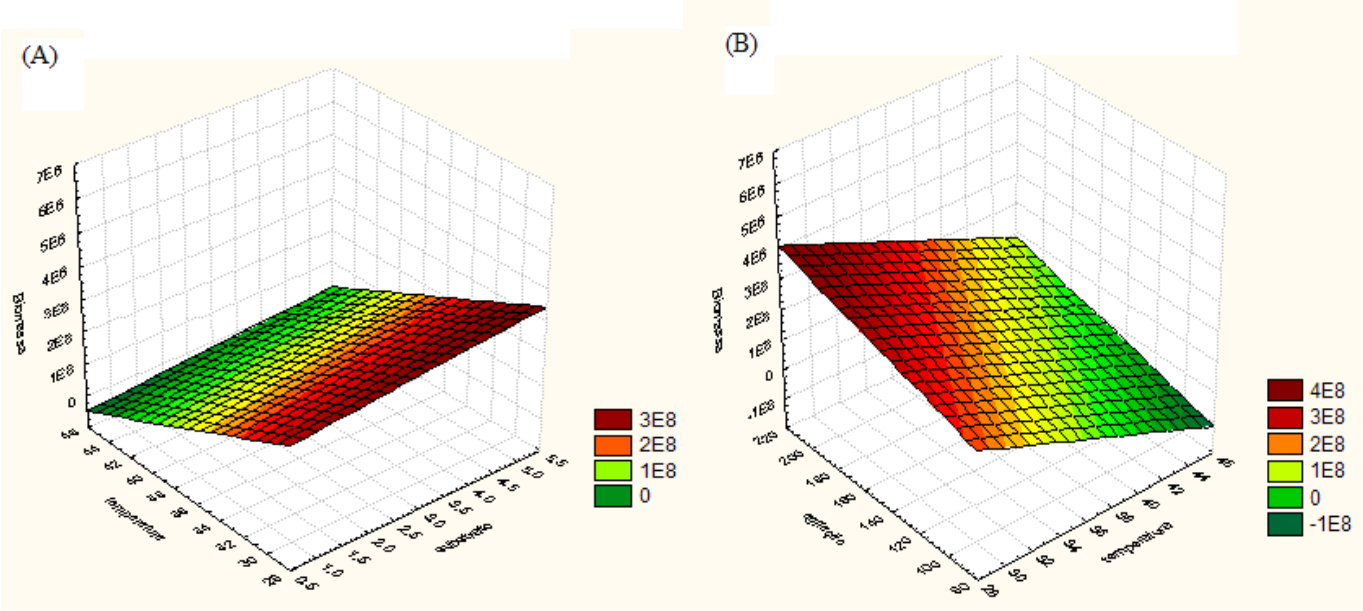


Tabela 8. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1}, utilizando o substrato sacarose, com duas repetições no ponto central, para o crescimento microbiano, tensão superficial, índice de emulsificação com tolueno e índice de emulsificação com óleo de soja com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p<0,05$).

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	C.M *$X_{2,3,4}$	T.S *X_3	I.E t *X_2	I.E o **
1	1,0	24,0	30,0	100	$1,8x10^8$	35	0,0	40,0
2	5,0	24,0	30,0	200	$5,7x10^8$	32	0,0	36,6
3	1,0	96,0	30,0	200	$2,5x10^8$	37	43,3	40,0
4	5,0	96,0	30,0	100	$1,1x10^8$	32	36,6	33,3
5	1,0	24,0	45,0	200	$1,0x10^7$	49	13,3	33,3
6	5,0	24,0	45,0	100	$7,0\ x10^6$	50	10,0	33,3
7	1,0	96,0	45,0	100	$2,1x10^7$	50	36,6	40,0
8	5,0	96,0	45,0	200	$2,4x10^7$	51	16,6	33,3
9 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$5,3x10^7$	49	46,6	23,3
10	1,0	24,0	30,0	100	$1,9x10^8$	33	0,0	33,3
11	5,0	24,0	30,0	200	$5,9x10^8$	34	0,0	40,0
12	1,0	96,0	30,0	200	$2,7x10^8$	36	43,3	33,3
13	5,0	96,0	30,0	100	$1,0x10^8$	31	30,0	33,3
14	1,0	24,0	45,0	200	$1,0x10^7$	50	16,6	33,3
15	5,0	24,0	45,0	100	$7,0x10^6$	51	13,3	36,6
16	1,0	96,0	45,0	100	$1,8x10^7$	51	36,6	36,6
17	5,0	96,0	45,0	200	$1,8x10^7$	51	16,6	40,0
18 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$5,4x10^7$	50	46,6	26,6
19	1,0	24,0	30,0	100	$2,0x10^8$	34	0,0	33,3
20	5,0	24,0	30,0	200	$5,8x10^8$	33	0,0	33,3
21	1,0	96,0	30,0	200	$2,8x10^8$	41	43,3	33,3
22	5,0	96,0	30,0	100	$1,0x10^8$	32	26,6	36,6
23	1,0	24,0	45,0	200	$1,1x10^7$	48	20,0	30,0
24	5,0	24,0	45,0	100	$9,0x10^6$	49	16,6	40,0
25	1,0	96,0	45,0	100	$2,0x10^7$	51	33,3	40,0
26	5,0	96,0	45,0	200	$2,0x10^7$	51	23,3	33,3
27 (C)	3,0	60,0	37,5	150	$5,6x10^7$	48	46,6	33,3

* Variáveis independentes estatisticamente significativas. ** Nenhuma.
(C): ponto central.
x_1: concentração de sacarose (g/L); x_2: tempo (h); x_3: temperatura (°C); x_4: agitação (rpm); C.M: crescimento microbiano; T.S: tensão superficial; I.Et: índice de emulsificação com tolueno; I.Eo: índice e emulsificação com óleo de soja.

5.2 DETERMINAÇÃO DO pH FINAL

Uma importante característica da maioria dos micro-organismos é sua forte dependência do pH para o crescimento celular e produção de metabólitos secundários. Foi verificado o valor do pH após cada tempo de fermentação determinado pelo delineamento. Os resultados demonstraram que ocorreu uma variação do pH ao longo da fermentação em relação ao pH inicial de 7,0 sendo esta mudança diferente entre os substratos e entre as diferentes condições de fermentação. Os resultados de pH final do meio fermentativo para todos os substratos testados estão listados na Tabela 9. De maneira geral observa-se que a maior temperatura (45ºC) foi um fator importante no que diz respeito à diminuição ou aumento do pH do meio de cultivo.

Rodrigues e colaboradores (2006b), observaram quando usando soro de queijo como substrato, que a lenta produção de biossurfactante pode estar associada com a redução do pH durante o processo de fermentação; segundo eles a redução do pH é resultado da produção simultânea de ácido lático que drasticamente provoca mudanças no meio de cultivo e pode ser responsável pela inibição da produção de biossurfactante. Assim, também como valores altos de pH podem significar resultados positivos de produção de biossurfactante (NAJAFI et al., 2010).

Quando utilizado o substrato manipueira foi observado que houve um aumento do pH em relação ao pH inicial de 7,0, este fato parece estar associado com o crescimento microbiano, uma vez que, pode-se traçar um paralelo entre os menores valores de UFC/mL e maiores valores de pH. O aumento do pH pode ser explicado devido a secreção de substâncias no meio ou mesmo pela liberação de substâncias em decorrência da lise celular.

Ao contrário do substrato manipueira, quando se utilizou o substrato melaço foi verificada uma diminuição do pH em torno de 5,9 (Tabela 9) neste, foram observados menores valores de unidades formadores de colônias ($3,4 \times 10^7$ UFC/mL) na temperatura de 45ºC; assim como o maior número de células viáveis ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) foi verificado no maior valor de pH. De acordo com Ferreira (2007), o declínio do pH em algumas concentrações de substratos pode estar associado ao catabolismo dos carboidratos que resulta na produção de ácidos.

Houve uma tendência de aumento do pH quando utilizado o substrato soro de queijo mesmo em temperaturas menores, o aumento ou diminuição do pH não foi proporcional ao crescimento microbiano.

Quando utilizada a sacarose como fonte de carbono houve uma acidificação do meio de cultivo em todas as condições testadas, sendo na temperatura de 45ºC os menores valores de pH encontrados, em torno de 5,3 e também os menores valores de UFC/mL da bactéria *Bacillus pumilus* (7,0 x 10^6).

Tabela 9. Resultados obtidos para os valores de pH final do meio de cultura utilizando os substratos: manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose na fermentação com a bactéria *Bacillus pumilus*.

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	Manipueira pH	Melaço pH	Soro pH	Sacarose pH
1	1,0	24,0	30,0	100	7,25	6,40	6,90	6,33
2	5,0	24,0	30,0	200	7,24	6,80	8,30	6,37
3	1,0	96,0	30,0	200	8,91	8,99	7,61	6,20
4	5,0	96,0	30,0	100	8,12	6,58	8,72	5,86
5	1,0	24,0	45,0	200	8,12	6,08	7,81	5,32
6	5,0	24,0	45,0	100	7,32	6,52	8,56	5,30
7	1,0	96,0	45,0	100	8,82	6,92	8,44	5,31
8	5,0	96,0	45,0	200	8,96	5,92	8,30	5,20
9 (C)	3,0	60,0	37,5	150	8,34	6,12	8,44	5,64
10	1,0	24,0	30,0	100	7,18	6,40	7,20	6,35
11	5,0	24,0	30,0	200	7,15	6,80	8,33	6,30
12	1,0	96,0	30,0	200	8,89	8,98	7,64	5,83
13	5,0	96,0	30,0	100	8,28	6,50	8,69	5,75
14	1,0	24,0	45,0	200	8,12	6,05	7,78	5,35
15	5,0	24,0	45,0	100	7,40	6,49	8,56	5,34
16	1,0	96,0	45,0	100	8,87	6,85	8,45	5,54
17	5,0	96,0	45,0	200	9,31	6,0	8,30	5,31
18 (C)	3,0	60,0	37,5	150	8,30	6,09	8,42	5,67
19	1,0	24,0	30,0	100	7,20	6,45	7,00	6,30
20	5,0	24,0	30,0	200	7,18	6,78	8,31	6,24
21	1,0	96,0	30,0	200	8,95	9,10	7,62	5,95
22	5,0	96,0	30,0	100	8,25	6,54	8,70	5,78
23	1,0	24,0	45,0	200	8,00	6,07	7,90	5,37
24	5,0	24,0	45,0	100	7,34	6,48	8,56	5,35
25	1,0	96,0	45,0	100	8,72	6,99	8,4	5,37
26	5,0	96,0	45,0	200	9,10	5,98	8,30	5,30
27 (C)	3,0	60,0	37,5	150	8,39	6,10	8,49	5,62

(C): ponto central. x_1: concentração do substrato (g/L); x_2: tempo (h); x_3: temperatura (°C); x_4: agitação (rpm).

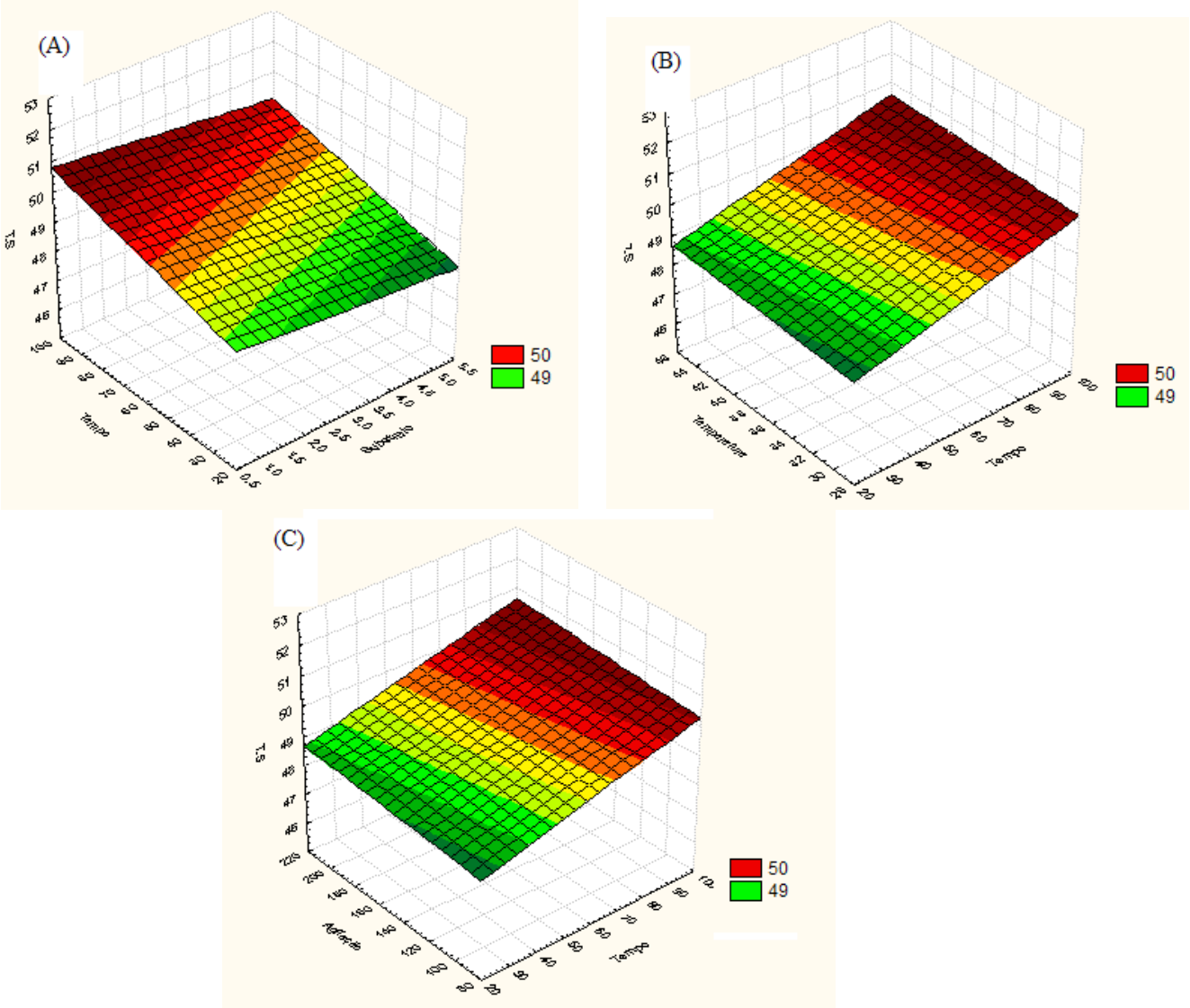
5.3 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL

A determinação da tensão superficial foi realizada nos caldos fermentados livre de células após serem centrifugados para separação das células do sobrenadante. Esta medição foi utilizada como indicador qualitativo da produção de biossurfactante, quanto maior a concentração do tenso-ativo no meio maior será a redução da tensão superficial.

Analisando a redução da tensão superficial quando utilizado o substrato manipueira foi verificado que apenas a variável tempo teve influência estatisticamente significativa ($p>0,05$) como observado na Tabela 5 e Figura 10. Entretanto, outros parâmetros também são importantes na redução da tensão superficial do meio de cultivo. Para a bactéria *Bacillus pumilus*, esse fato não foi confirmado para manipueira. Em 2012, Bezerra e colaboradores observaram que a temperatura de cultivo acompanhada pela agitação são fatores preponderantes na síntese do metabólito, apresentando resultados ótimos de redução da tensão superficial quando verificado por *Pseudomonas aeruginosa* com o substrato manipueira, utilizando o mesmo planejamento fatorial realizado no presente estudo.

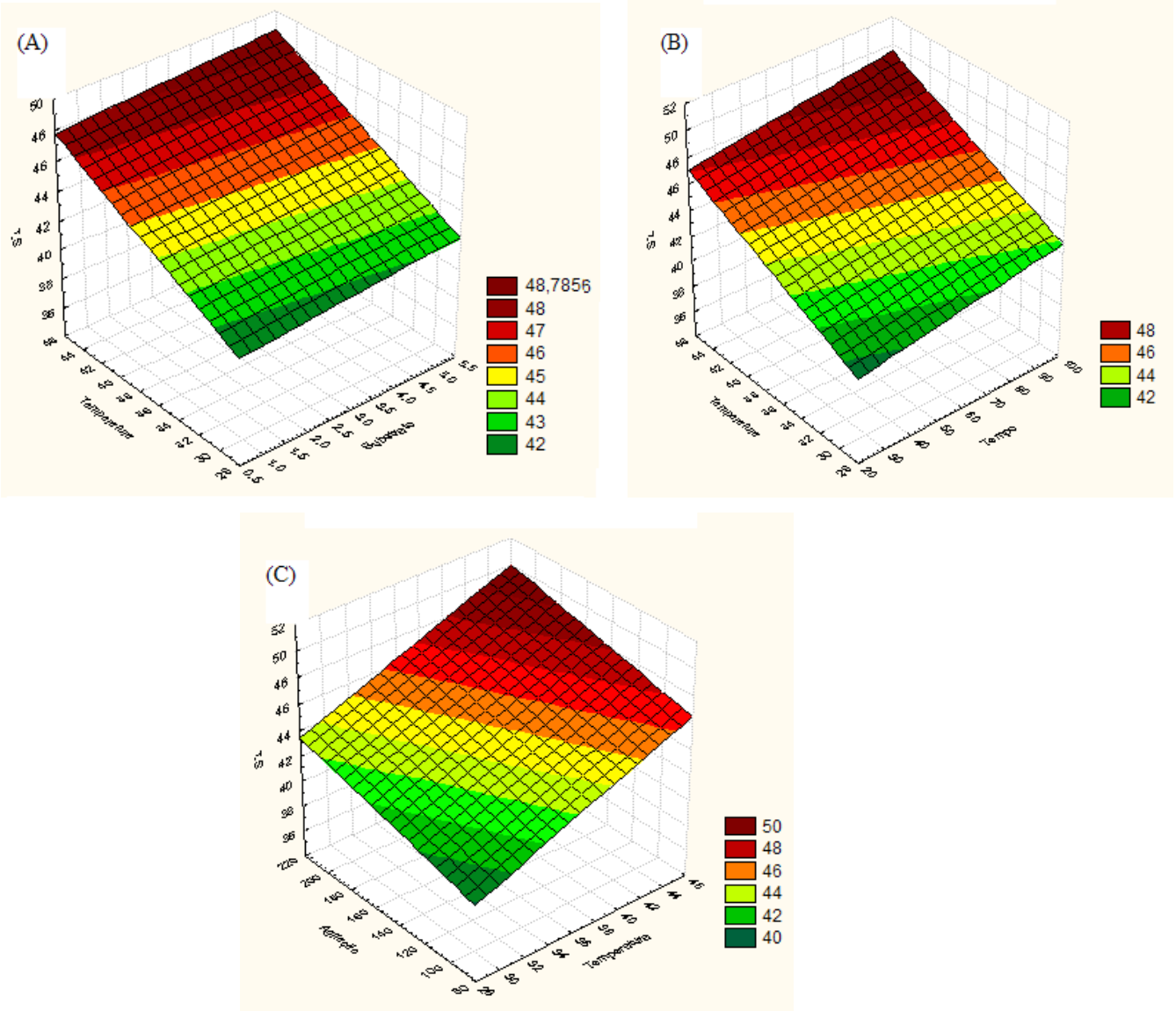
Os menores valores de tensão encontrados quando usada manipueira, em torno de 46 mNm^{-1}, foram verificados na maior concentração do substrato testado (5%) e menor tempo de fermentação (24 horas). Este resultado foi melhor que o encontrado por Bento e colaboradores (2003) onde o valor da tensão superficial do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus*, utilizando meio de cultura a base de sais e extrato de levedura como fonte de carbono, foi de 49,5 mNm^{-1}. Por outro lado, Nitschke e Pastore (2006), verificaram uma ótima redução da tensão superficial de 26,6 mNm^{-1} pela bactéria *Bacillus subtilis* utilizando manipueira pura como substrato após 12 horas de fermentação. A composição do meio de cultivo pode ser caracterizada como fator importante para o rendimento do produto bem como para as propriedades surfactantes (SHEPPARD; MULLIGAN, 1987).

Figura 10. Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 48,4606-0,1458*x+0,0243*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 47,3981+0,0243*x+0,0167*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 47,6481+0,0243*x+0,0025*y).



Como observado na Figura 11, utilizando o substrato melaço, as variáveis tempo, temperatura e agitação tiveram influência estatística significativa ($p<0,05$) na redução da tensão superficial (Tabela 6). A maior redução da tensão superficial (em torno de 37 mNm^{-1}) ocorreu no menor tempo de fermentação, temperatura e agitação do meio (Figura 11).

Figura 11. Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 30,7731+0,2083*x+0,3667*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 29,5926+0,0301*x+0,3667*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 27,6481+0,3667*x+0,025*y).



Joshi e colaboradores (2008) também verificaram que a concentração de melaço não apresentava influência na redução da tensão superficial quando utilizadas outras espécies do gênero *Bacillus*, porém, foram encontrados valores de tensão superficial inferiores a 35 mNm^{-1}, na temperatura de 45ºC. Contudo, no presente estudo, utilizando a mesma temperatura foram observados valores superiores a 40 mNm^{-1}. Este fato pode ser atribuído a diferenças observadas na utilização do substrato com diferentes polaridades e,

portanto, diferenças quanto à redução da tensão superficial (VAN HAMME et al., 2006). Desta forma é importante considerar que o substrato age de forma diferente para micro-organismos específicos mudando as propriedades do produto final.

No uso do substrato soro nas fermentações do planejamento estatístico fatorial fracionado 2^{4-1}, somente a temperatura foi significativa estatisticamente ($p<0,05$) quanto à redução da tensão superficial (Tabela 7). De acordo com a Figura 12, foram observadas melhores reduções de tensão superficial quando em baixa agitação e menor tempo de fermentação. No presente estudo o menor valor alcançado foi 47 mNm^{-1}. Este resultado foi similar ao encontrado por Rodrigues e colaboradores (2006b), que alcançaram o menor valor de 45 mNm^{-1} pela bactéria *Lactobacillus pentosus* em soro.

Quando utilizado o substrato sacarose, da mesma forma que observado para o substrato soro, somente a temperatura apresentou-se significativa estatisticamente ($p<0,05$) pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 8). A redução da tensão superficial foi maior nas temperaturas menores (32 mNm^{-1}), assim como a menor redução de tensão observada para esse substrato (51 mNm^{-1}) ocorreu na maior temperatura testada de 45ºC (Figura 13).

Khopade e colaboradores (2012) obtiveram melhor redução da tensão superficial de 29 mNm^{-1} pelo biossurfactante produzido pela bactéria *Streptomyces* sp. B3 quando utilizado 2% de sacarose como única fonte de carbono, porém, também verificaram que a melhor atividade do biossurfactante alcançada foi quando a fermentação ocorreu em menores temperaturas (30ºC).

De acordo com a literatura, os micro-organismos para serem considerados bons produtores de biossurfactantes devem reduzir a tensão superficial do sobrenadante em relação com a da água abaixo de 40 mNm^{-1} e em torno de 35 mNm^{-1} (DESAI; BANAT, 1997; BATISTA et al., 2006). Em nosso trabalho, a melhor atividade tenso-ativa alcançada foi quando usado o substrato sacarose como fonte de carbono. O tenso-ativo produzido nesse meio foi capaz de reduzir a tensão superficial em até 32 mNm^{-1}, o que significa uma redução de 56% em relação à da água (72,8 mNm^{-1}). Este resultado encontrado com o substrato sacarose indica que a bactéria *Bacillus pumilus* produz um biossurfactante com grande poder redutor da tensão superficial.

O resultado obtido no presente estudo foi melhor que o encontrado por Ghojavand e colaboradores (2008) utilizando sacarose como fonte de carbono, eles obtiveram uma redução de 35 mNm^{-1} por um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* PTCC 1696 (*Persian Type Cultura Collection*).

Neste estudo a maior atividade tenso-ativa ocorreu na menor temperatura testada, onde também foi verificado o maior número de células viáveis. Contudo, pode-se concluir que houve uma relação direta do crescimento microbiano no meio de cultivo e a redução da tensão superficial em todos os substratos testados, exceto para o substrato soro de queijo.

Figura 12. Superfícies de resposta utilizando soro de queijo como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 45,5648-0,1667*x+0,1*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 44,3704+0,0116*x+0,1*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 47,1204+0,0116*x+0,0067*y).

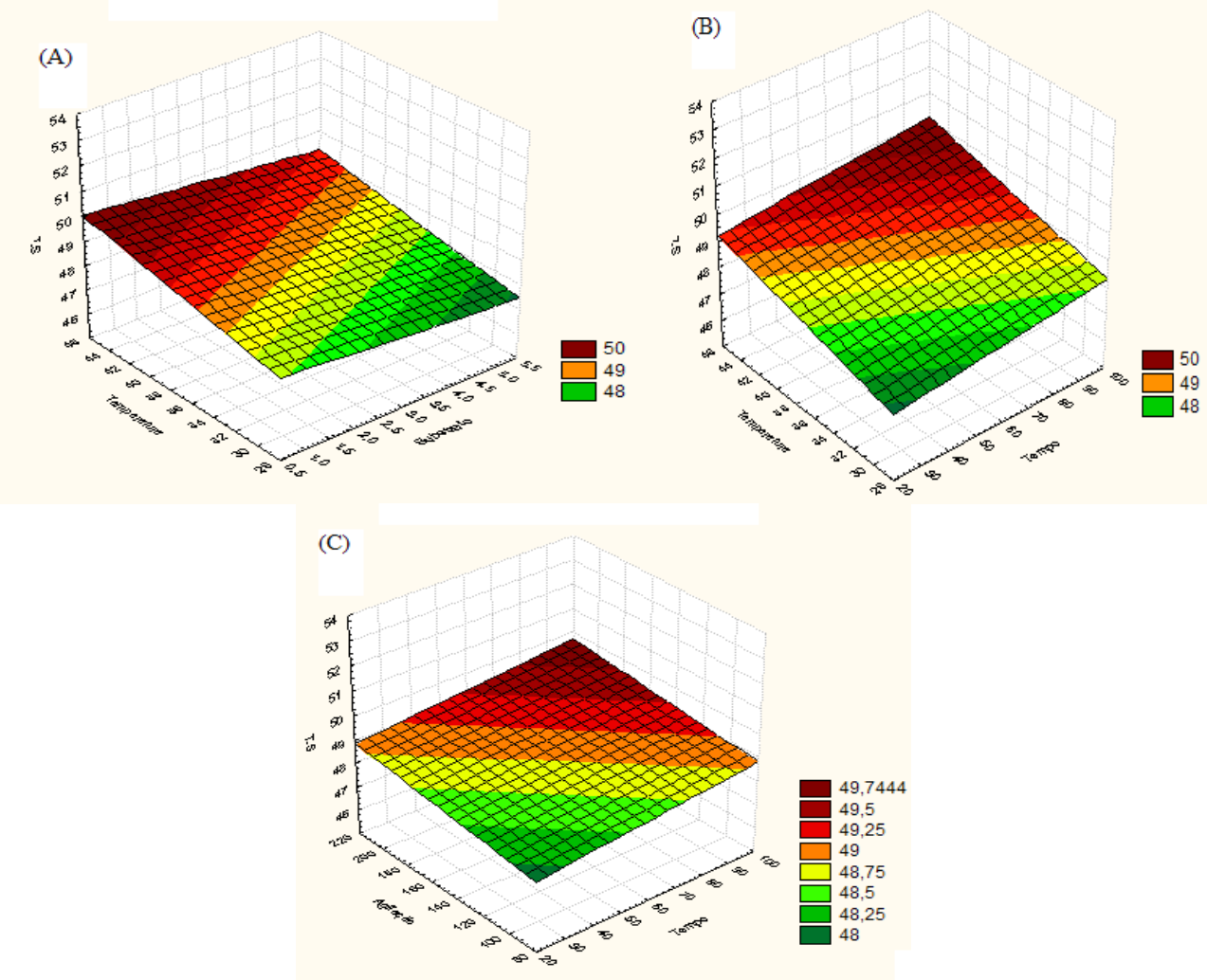
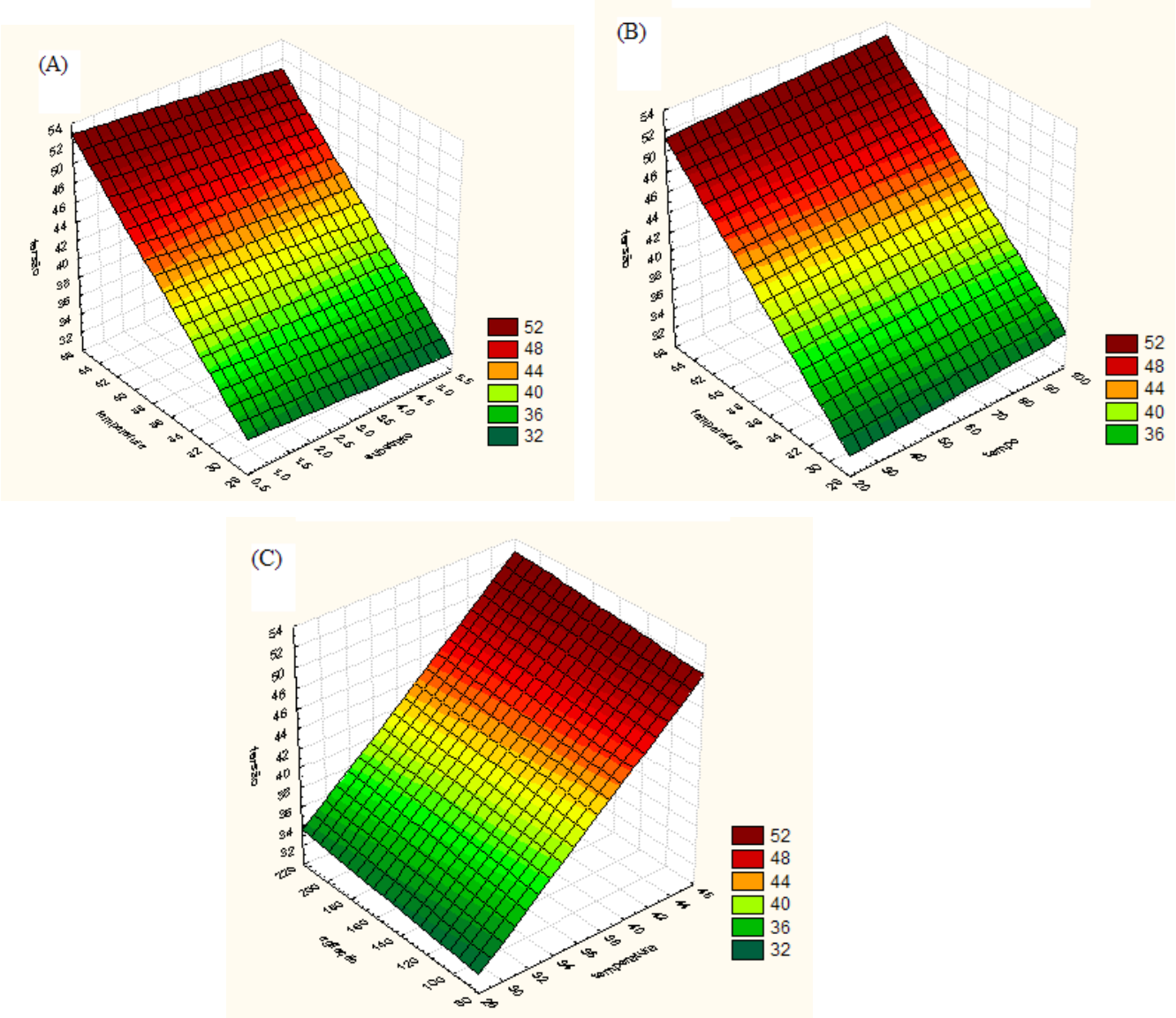


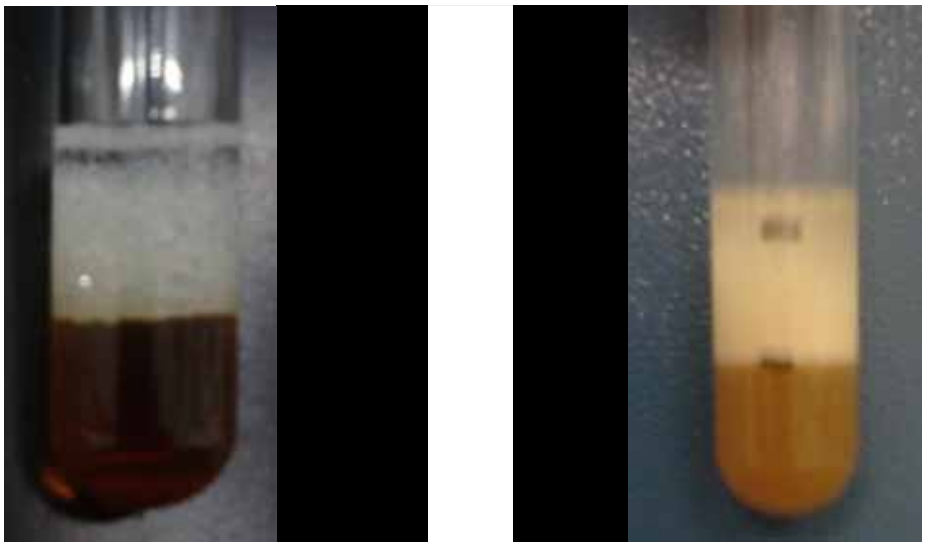
Figura 13. Superfícies de resposta utilizando sacarose como substrato para (A) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 4,0509-0,375*x+1,0667*y); (B) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: 1,8148+0,0185*x+1,0667*y); (C) tensão superficial (mNm^{-1}) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e temperatura (ºC) (equação: 1,1759+1,0667*x+0,0117*y).



5.4 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

O índice de emulsificação é uma análise direta da presença de biossurfactante no caldo fermentado livre de células. Sua presença está relacionada com altos índices de emulsificação e estabilidade do emulsificado. No planejamento experimental foram verificados os índices de emulsificação com o hidrocarboneto tolueno e com óleo de soja, como ilustrado na Figura 14.

Figura 14. Emulsificação de tolueno adicionado ao caldo livre de células para a determinação do índice de emulsificação do biossurfactante produzido com melaço (a). Emulsificação de óleo de soja adicionado ao caldo livre de células para a determinação do índice de emulsificação do biossurfacante produzido com melaço (b).



(a) (b)

Por meio do estudo da análise de variância (ANOVA), utilizando o substrato manipueira foi verificada interferência estatisticamente significativa ($p<0,05$) da temperatura quando utilizado o hidrocarboneto tolueno (Tabela 5). O índice de emulsificação foi maior com o caldo de cultivo fermentado em maior temperatura. Analisando a Figura 15, verifica-se que foi necessário maior tempo de incubação e maior concentração do substrato para o aumento do índice de emulsificação. Em estudos com *Pseudomonas aeruginosa* utilizando manipueira foram obtidos valores entre 50% a 68% de índice de emulsificação com querosene (BEZERRA et al., 2012).

Pela ANOVA, utilizando o óleo de soja com o caldo livre de células produzido com manipueira foi verificada somente a interferência estatisticamente significativa ($p<0,05$) da concentração do substrato no índice de emulsificação. Observando a Figura 16, na interação de substrato e temperatura, o índice aumenta com o aumento da concentração de substrato.

A capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus* foi avaliada frente a vários hidrocarbonetos e óleos vegetais sendo verificados índices similares para tolueno e óleo de soja 53% e 52%, respectivamente, entretanto a fermentação foi realizada em estado sólido (SLIVINSKI et al., 2012). Prieto e colaboradores (2008) também reportaram que óleo de soja é um bom substrato para emulsificação, porém com o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Resultado contrário foi verificado por Abbasi e colaboradores (2012), que observaram os índices de emulsificação com óleos foram menores quando comparados com hidrocarbonetos; também observaram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio à base de óleo de soja só poderia emulsificar óleo de milho e óleo de coco no máximo até de 50%.

Com relação ao biossurfactante obtido com o substrato melaço emulsificado com tolueno, utilizando a ANOVA, todas as variáveis tiveram influência estatística significativa ($p<0,05$) (Tabela 6). O máximo índice de emulsificação foi verificado em torno de 40%, maior temperatura, maior tempo de incubação e menor agitação foram determinantes para o aumento do índice de emulsificação (Figura 17). A menor agitação do meio de cultivo também foi interferente para a redução da tensão superficial. Este resultado foi melhor que o encontrado por Aparna e colaboradores (2012), 38% e 33%, quando usado hexano e benzeno, respectivamente, na emulsificação com o biossurfactante obtido por *Pseudomonas* sp. 2B produzido com melaço como substrato.

Para a emulsificação com óleo de soja, foi observado pela ANOVA ($p<0,05$) interferência da concentração do substrato melaço e do tempo de fermentação (Tabela 6). O melhor índice encontrado, 40-50%, foi verificado na concentração de 1%, 96 horas, sob agitação de 100 rpm e temperatura de 45ºC (Figura 18).

O estudo da ANOVA para a análise de índice de emulsificação com o hidrocarboneto tolueno para o substrato soro de queijo mostrou que apenas a variável concentração do substrato teve interferência estatística significativa ($p<0,05$) como mostrado na Tabela 7; quanto menor a concentração do substrato melhor o índice de

emulsificação (Figura 19). O melhor resultado (46,6%) foi observado na concentração de 1%, 45ºC, em 96 horas sob agitação de 100 rpm.

O planejamento experimental com soro de queijo mostrou por meio do estudo da análise de variância (ANOVA) que nenhuma variável foi significativa estatisticamente ($p<0,05$) para o índice de emulsificação com óleo de soja (Tabela 7). Os resultados variaram de 33-40%.

Analisando o substrato sacarose, foi verificado pela ANOVA que o tempo teve interferência estatística significativa ($p<0,05$), para o índice de emulsificação com o hidrocarboneto tolueno (Tabela 8). De acordo com a Figura 20, verificou-se que na interação da concentração do substrato e do tempo de fermentação, a menor concentração do substrato e um tempo maior de fermentação favoreceram para obtenção de um índice de emulsificação maior. O melhor valor de 46,6% foi observado no ponto central, na concentração de 3%, temperatura de 37,7ºC, agitação do meio de cultivo de 150 rpm por 60 horas de incubação. Este resultado foi melhor que o obtido por Shavandi e colaboradores (2011) que utilizando o biossurfactante produzido pela bactéria *Rhodococcus* sp., observaram que o hidrocarboneto tolueno não foi emulsificado efetivamente, apresentando valores inferiores a 30% quando utilizada sacarose como fonte de carbono.

Com relação ao índice de emulsificação com óleo de soja, não foi observada influência estatisticamente significativa ($p<0,05$) de nenhuma das variáveis testadas, assim como com o substrato soro de queijo. Os resultados alcançaram o índice máximo de 40%.

De modo geral, não houve relação entre os maiores índices de emulsificação e a redução da tensão superficial. A partir desses resultados, este trabalho sugere que a atividade de emulsificação não é determinada pela tensão superficial. O mesmo resultado foi verificado por Shavandi e colaboradores (2011) que observaram que emulsificação é dependente da interação direta da porção hidrofóbica do biossurfactante com o hidrocarboneto testado. Por outro lado, o biossurfactante produzido pode ser classificado como um bioemulsificante de acordo com o peso molecular, estes formam emulsões estáveis, mas podem não exibir redução significativa da tensão superficial e interfacial. (DASTGHEIB et al., 2008).

Figura 15. Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 8,3025+0,1505*x-0,0028*y); (B) índice de emulsificação (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: -26,2114+1,1806*x+1,0556*y).

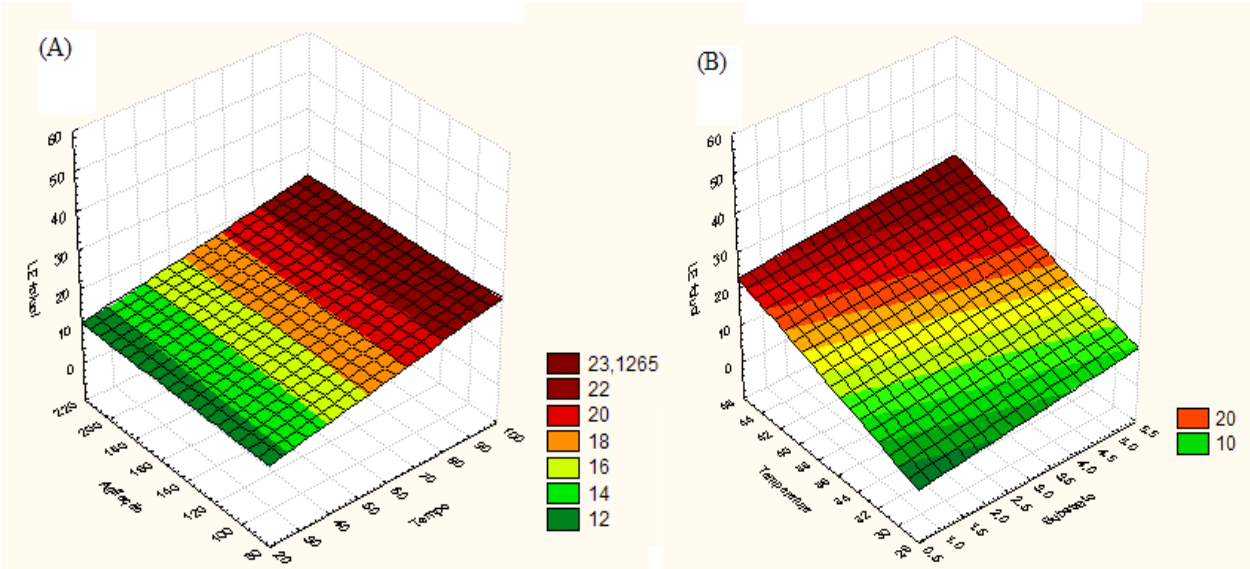


Figura 16. Superfícies de resposta utilizando manipueira como substrato para (A) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 27,338+2,2917*x-0,027*y); (B) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: 30,5787+2,2917*x-0,1296*y).

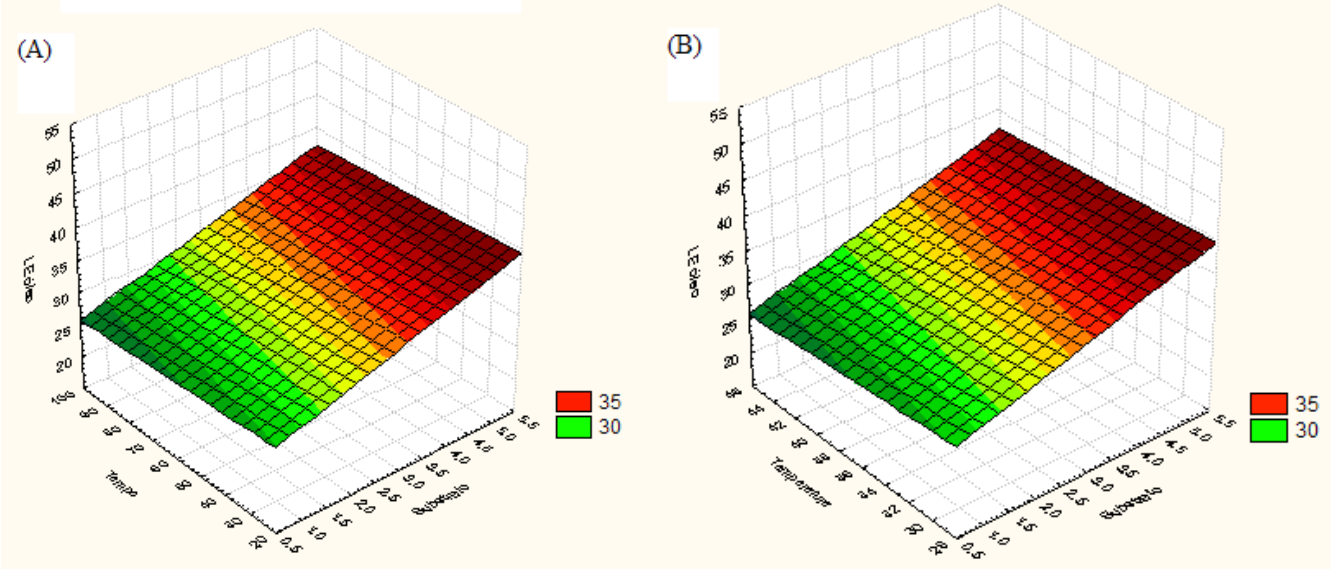


Figura 17. Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e tempo (horas) (equação: -33,7037+0,1852*x+1,1852*y); (B) índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de agitação (rpm) e tempo (horas) (equação: 24,0741+0,1852*x-0,0889*y).

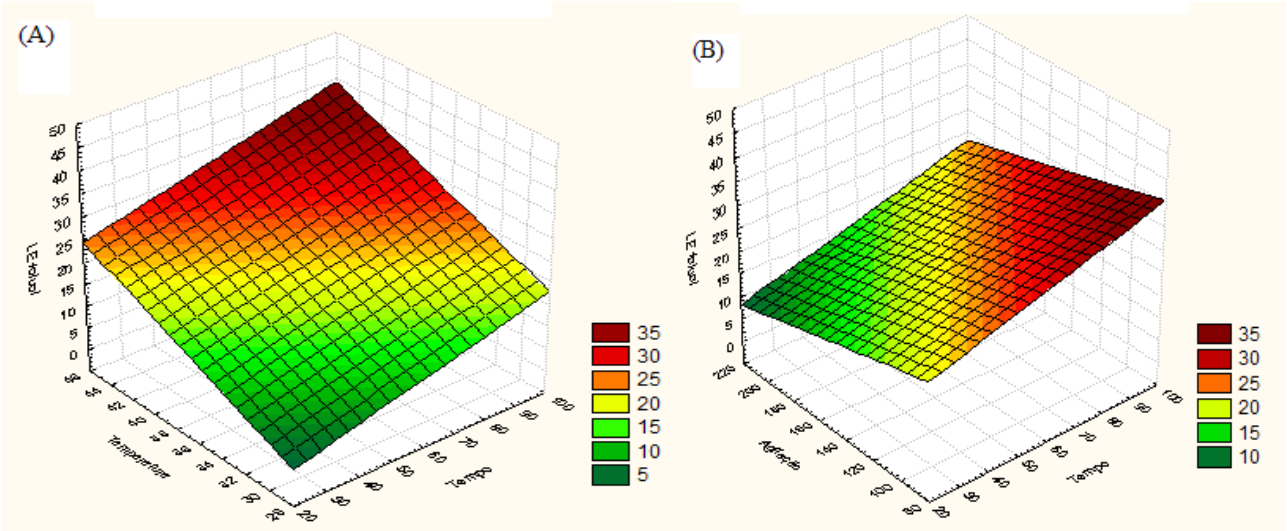


Figura 18. Superfícies de resposta utilizando melaço como substrato para (A) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 35,2855-2,0139*x+0,0579*y); (B) índice de emulsificação com óleo de soja (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura (ºC) e concentração do substrato (g/L) (equação: I.E óleo = 40,841-2,0139*x-0,0556*y).

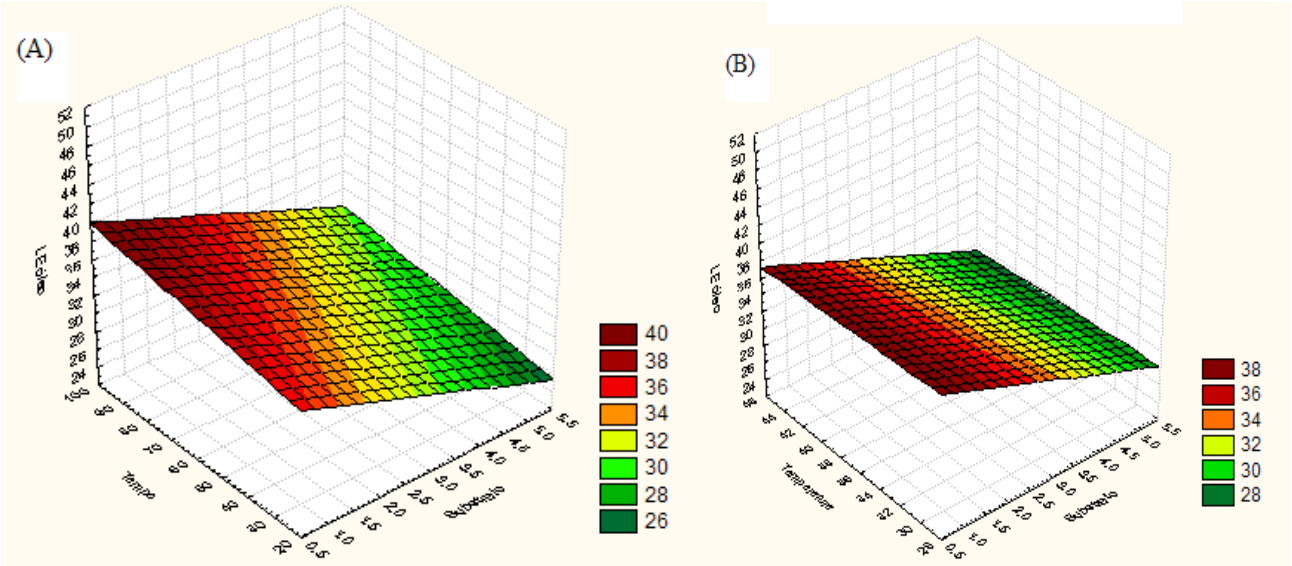


Figura 19. Superfícies de resposta utilizando soro de queijo como substrato para o índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de temperatura e concentração do substrato (g/L) (equação: 37,6775-8,2639*x+0,1667*y).

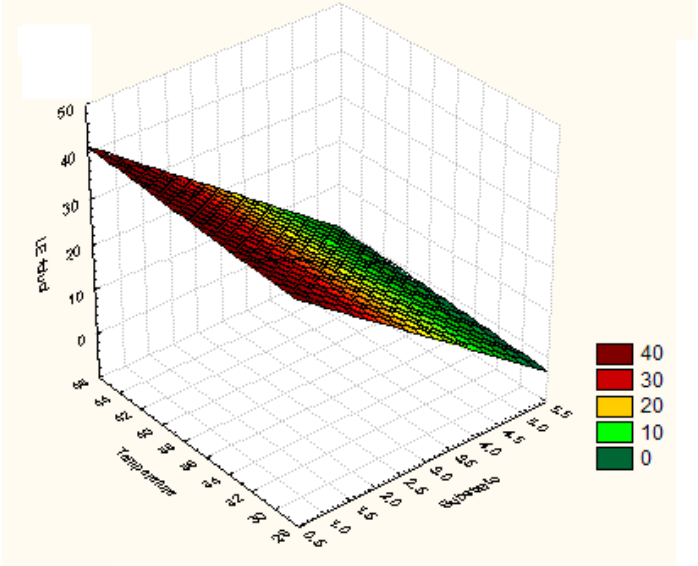
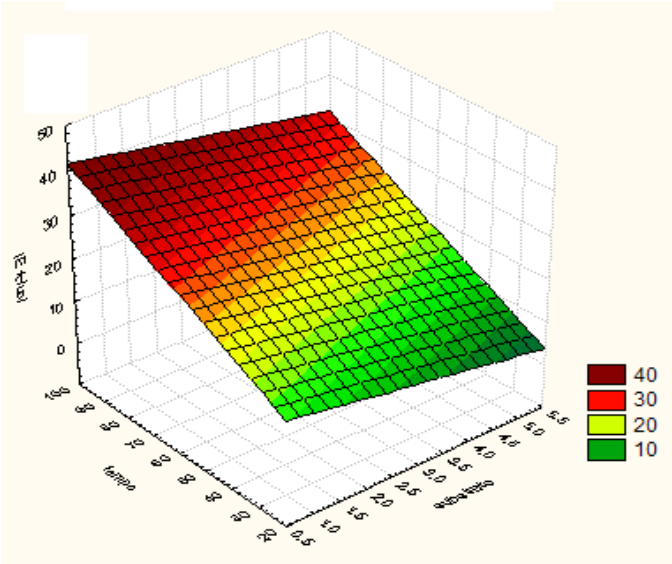


Figura 20. Superfícies de resposta utilizando sacarose como substrato para o índice de emulsificação com tolueno (%) ao redor dos valores ótimos de tempo (horas) e concentração do substrato (g/L) (equação: 8,2793-2,0139*x+0,3434*y).



5.5 PARÂMETROS SELECIONADOS

Uma vez que, a tensão superficial é indicador indireto da produção de biossurfactante (FOX; BALA, 2000), esta análise foi escolhida como parâmetro para

determinar a melhor condição de cultivo de produção pela bactéria *Bacillus pumilus* para todos os substratos testados. A Tabela 10 mostra quais condições de fermentação foram repetidas para cada substrato testado, a fim de avaliar a diluição micelar crítica, concentração bruta de biossurfactante e análise de estabilidade frente variações de temperatura, pH e salinidade. Foram levadas em consideração as variáveis que tiveram influências estatisticamente significativas ($p<0,05$), bem como as análises dos gráficos de superfície de resposta.

Tabela 10. Parâmetros selecionados para fermentação pela bactéria *Bacillus pumilus* com os substratos, manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose.

Substrato	Concentração (%)	Tempo (horas)	Temperatura (ºC)	Agitação (rpm)
Manipueira	5	24	30	100
Melaço	1	24	30	100
Soro	5	24	30	100
Sacarose	1	24	30	200

5.5.1 Determinação da diluição micelar crítica (CMD)

A diluição micelar crítica (CMD) é uma análise que indica indiretamente a concentração de surfactante (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Quanto menor o valor de CMD maior é a concentração do biopolímero no meio. Os resultados de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} para todos os experimentos nas melhores condições de cultivo estão mostrados na Tabela 11. Pelos valores obtidos é possível sugerir que a maior produção de biossurfactante foi alcançada quando se utilizou o substrato sacarose.

Na literatura os valores de CMD variam muito, pois as variáveis de fermentação são distintas influenciando assim na produção e nas propriedades do produto obtido (JOSHI et al., 2008; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; SHAVANDI et al., 2011). De um modo geral, no presente trabalho foram observados valores altos de CMDs, sendo o caldo fermentado com sacarose o menor valor obtido de tensão superficial.

Tabela 11. Valores de tensão superficial e diluição micelar crítica (CMD) para todos os substratos testados nas melhores condições de fermentação pela bactéria *Bacillus pumilus*.

Substratos	T.S (mNm^{-1})	CMD^{-1} (mNm^{-1})	CMD^{-2} (mNm^{-1})
Manipueira	46	51	61
Melaço	37	52	57
Soro	47	58	64
Sacarose	32	47	56

5.5.2 Produção bruta de biossurfactante

Nos parâmetros selecionados, foi determinada a produção bruta de biossurfactante em g/L no caldo livre de células.

Quando utilizado o substrato manipueira foi verificada a produção de 1,12 g/L com a concentração de 5% após 24 horas de fermentação à 30ºC e 100 rpm. Este resultado não foi tão bom quanto o alcançado por Nitschke e Pastore (2006), que obtiveram um valor de 3,0 g/L com a bactéria *Bacillus subtilis*, porém utilizaram somente a manipueira pura após 48 horas de fermentação e 150 rpm de agitação.

Na fermentação com o substrato melaço foi observada a produção de 0,35 g/L quando testada a concentração de 1%. Este resultado é similar ao encontrado por Makkar e Cameotra (1997), onde foi observada a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* inferior à 1 g/L utilizando o substrato melaço na concentração de 2% em açúcar total.

A produção bruta utilizando o substrato soro de queijo foi de 1,4 g/L nas condições testadas. O mesmo valor de 1,4 g/L foi encontrado por Rodrigues e colaboradores (2006b) quando utilizado *Lactobacillus pentosus* na fermentação com o mesmo substrato. Dubey e Juwarkar (2001) obtiveram um rendimento de 0,97 g/L de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* BS2. O potencial do soro como substrato alternativo para produção de biossurfactante por micro-organismos é evidente, contudo é importante considerar que as diferenças de produção, bem como as propriedades do polímero produzido são afetadas pelo micro-organismo produtor e pelas condições de cultivo utilizadas.

No uso da sacarose foi verificada maior produção de biossurfactante pela bactéria *Bacillus pumilus*, 5,1 g/L. Este resultado era esperado uma vez que utilizando este substrato foi verificada a melhor atividade tenso-ativa (32 mNm^{-1}). No entanto, a menor

produção observada, 0,35 g/L, foi com o substrato melaço, onde foi evidenciada uma boa redução da tensão superficial, abaixo de 40 mNm^{-1}, este fato sugere que nem sempre os menores valores de tensão superficial estão relacionados com a maior concentração de biossurfactante presente no meio (GOLVEIA et al., 2003).

Com base nos resultados obtidos, todos os substratos testados apresentaram potencial para produção de um biossurfactante. Contudo, fica evidente a influência de parâmetros físicos como a fonte de carbono (tipo e concentração) para a determinação da concentração da molécula tenso-ativa no meio de cultivo, bem como para suas propriedades.

5.5.3 Teste de estabilidade

A avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus* foi realizada frente a variações de temperatura, pH e salinidade. Essa análise é importante, uma vez que, os biossurfactantes são sugeridos para o uso em aplicações industriais e ambientais, sendo estes processos freqüentemente associados a condições extremas.

Para todas as condições testadas os valores obtidos na determinação da CMD^{-2} foram pequenos e não foi observada nenhuma estabilidade frente às condições testadas, uma vez que o biossurfactante encontra-se muito diluído e, portanto, o valor de tensão superficial alcançado foi muito próximo ao da água (72,8 mNm^{-1}), motivo pelo qual não foi mostrado neste trabalho. A mudança na temperatura pode ser fator determinante, pelo fato de que causa alterações na composição do biossurfactante produzido, mudando assim suas propriedades (YOUSSEF et al., 2004; BENTO et al., 2005). Quando analisada a condição temperatura, não foram observadas mudanças significativas na atividade tenso-ativa do caldo livre de células e da CMD^{-1} para todos os substratos testados, mantendo-se estáveis por 2 horas na temperatura de 100ºC (Tabela 12). Este fato sugere que o biossurfactante isolado pode ser usado em muitos processos tecnológicos que necessitam do aumento de temperatura, como por exemplo, na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêuticos (PRIETO et al., 2008).

Muitos estudos confirmam estabilidade de biossurfactante frente a condições de temperatura extremas, utilizando diversos micro-organismos e fontes de carbono para

produção. Joshi e colaboradores (2008) verificaram a estabilidade por 9 dias a 80ºC do biossurfactante produzido por 4 isolados do gênero *Bacillus* utilizando melaço como substrato. Nitschke e Pastore (2006) verificaram estabilidade térmica por 2 horas na temperatura de 100ºC do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Khopade e colaboradores (2012) verificaram estabilidade térmica do biossurfactante produzido por *Streptomyces* B3 utilizando sacarose como substrato.

Tabela 12. Efeito da temperatura (100ºC) sobre a atividade tenso-ativa (mNm^{-1}) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos.

Aquecimento - 100 ºC	Manipueira	Melaço	Soro	Sacarose
Tempo – minutos	$T.S/CMD^{-1}$	$T.S/CMD^{-1}$	$T.S/CMD^{-1}$	$T.S/CMD^{-1}$
20	46/54	38/52	47/56	33/47
40	45/58	40/52	47/56	32/47
60	44/58	40/48	47/56	32/49
80	44/57	42/47	47/ 55	32/47
100	44/57	42/48	47/55	31/48
120	44/57	42/47	46/54	31/50

O efeito do pH sobre a estabilidade do biossurfactante produzido está mostrado na Tabela 13. De um modo geral, foi verificada oscilação da atividade tenso-ativa da molécula quando submetida a uma ampla faixa de pH (2-12), exceto para aqueles produzidos pelo substrato melaço. O mesmo resultado foi encontrado para a CMD^{-1}. Quando foram comparados os valores de tensão superficial, observou-se que houve uma estabilidade na faixa de pH 6-8, ou seja, próximo da neutralidade; e na faixa de 10-12, ou seja, na alcalinidade. Alguns trabalhos confirmam a estabilidade de biossurfactante em diferentes valores de pH, principalmente em meio alcalino (JOSHI et al., 2008; GHOJAVAND et al.,2008; AL-BAHRY et al., 2012).

A oscilação dos valores de tensão superficial ocorrida na faixa de pH testada mostra a dependência das propriedades surfactantes ao pH. O fato de ocorrer um aumento e subseqüente diminuição da tensão superficial acompanhada por mudanças de pH significa que a estrutura química do polímero é mantida (COOPER et al., 1981). Contudo, esta

característica se torna diferencial no polímero produzido neste trabalho, uma vez que, submetido a condições extremas de pH, há manutenção da estrutura original.

Tabela 13. Efeito do pH sobre a atividade tenso-ativa (mNm^{-1}) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos.

pH	Manipueira	Melaço	Soro	Sacarose
NaOH/HCl	$T.S/CMD^{-1}$	$T.S/CMD^{-1}$	$T.S/CMD^{-1}$	$T.S/CMD^{-1}$
2,0	40/57	37/54	40/56	36/62
4,0	45/56	37/55	45/52	37/60
6,0	44/57	37/55	44/53	32/61
8,0	45/58	36/54	43/55	33/60
10,0	40/58	36/54	45/56	32/52
12,0	41/59	35/54	44/57	33/54

A Tabela 14 mostra o efeito da adição de sal (NaCl) na atividade tenso-ativa do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus*. A atividade tenso-ativa frente à adição de sal foi diferente entre os substratos testados. Para o biossurfactante produzido com manipueira, foi verificado aumento da atividade tenso-ativa (diminuição da tensão superficial) a partir da concentração de 4% de NaCl, mantendo-se estável até 20%; o mesmo ocorreu com a CMD^{-1}.

Utilizando melaço foi verificada a estabilidade em todas as concentrações de NaCl testadas (2-20%); os resultados para a CMD^{-1} foram similares. Quando utilizado o substrato soro de queijo, o resultado foi similar ao encontrado com o substrato manipueira, foi verificado aumento da atividade tenso-ativa com o aumento da concentração de sal; resultado similar foi observado para a CMD^{-1}. Por fim, foi observada no sobrenadante formado pela fermentação com sacarose, uma redução da atividade tenso-ativa em relação ao valor inicial na ausência de sal, porém, em todas as concentrações testadas o biossurfactante se manteve estável; já para a CMD^{-1} ocorreu uma pequena variação.

A estabilidade do biossurfactante produzido frente altas concentrações de sais é uma característica importante, uma vez que podem ser úteis em desastres ecológicos marinhos, já que tais ambientes apresentam alta concentração salina (PRIETO et al., 2008; NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Tabela 14. Efeito da concentração de NaCl (%) sobre a atividade tenso-ativa (mNm^{-1}) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* utilizando manipueira, melaço, soro de queijo e sacarose como substratos.

Salinidade	Manipueira	Melaço	Soro	Sacarose
% NaCl	T.S/CMD-1	T.S/CMD-1	T.S/CMD-1	T.S/CMD-1
2,0	47/58	37/55	42/57	38/59
4,0	43/57	37/54	42/54	38/59
6,0	43/57	37/53	39/54	39/58
8,0	43/57	38/54	39/54	40/57
10,0	43/56	38/54	39/53	40/57
12,0	43/56	38/54	39/54	39/56
14,0	43/55	38/54	37/54	38/58
16,0	43/54	39/53	37/54	38/56
18,0	43/57	39/52	37/51	38/55
20,0	43/56	39/52	37/50	39/56

5.5.4 Produção em escala ampliada

O fato dos biossurfactantes apresentarem muitas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos atrai a atenção para produzi-los em larga escala para uso industrial. *Bacillus pumilus* foi usado para estudos de aumento de escala em fermentador de 3 L contendo 2,0 L de meio de cultivo com o substrato sacarose a fim de verificar o potencial desse micro-organismo em crescer e produzir biossurfactante com interessantes propriedades tenso-ativas. Avaliou-se a produção com 24, 48, 72 e 96 horas e em todos os tempos mediu-se crescimento microbiano (UFC/mL), tensão superficial e índice de emulsificação (Tabela 15).

Tabela 15. Tensão superficial, índice de emulsificação e crescimento microbiano determinados nos caldos livres de células obtidos durante 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação em escala ampliada utilizando sacarose como substrato na temperatura de 30ºC, pH de 7, agitação de 200 rpm e taxa de oxigênio 10-20%.

Tempo (h)	**Tensão superficial (mNm^{-1})**	**IE_{24} (%)**	**C.M (UFC/mL)**
24	29 ±0,3	50 ±0,02	$1,5x10^9$
48	26,3 ±0,05	40 ±0,05	$3,1x10^9$
72	32,0 ±0,05	20 ±0,3	$4,7x10^9$
96	29,3 ±0,3	33 ±0,02	$3,1x10^9$

Durante a fermentação em escala ampliada foi observado que as células se mantiveram viáveis em todos os tempos de fermentação. O crescimento microbiano foi maior no tempo de 72 horas onde não foi observado alto índice de emulsificação e maior redução da tensão superficial. Esse mesmo comportamento foi observado nas fermentações em nível de bancada, onde o crescimento celular também não foi proporcional à redução da tensão superficial e índice de emulsificação.

Os resultados encontrados para tensão superficial foram melhores utilizando o fermentador. Esse fato é importante, uma vez que a produção em escala ampliada não afetou as características do biossurfactante e poderia tornar este processo atrativo para sua exploração a nível comercial.

As bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente estudadas, uma vez que tem a característica de produção de potentes biossurfactantes com alta atividade tenso-ativa (NITSCHKE; PASTORE, 2006). No presente trabalho, em todos os tempos de fermentação houve boa redução da tensão superficial; após 48 horas de fermentação foi verificada a melhor redução de 26,3 mNm^{-1}. Resultado similar foi encontrado por Slivinsk e colaboradores (2012), onde o lipopeptideo produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 teve uma excelente propriedade tenso-ativa, reduzindo a tensão superficial em até 27 mNm^{-1}. Cooper e Goldenberg (1987) reportaram que *Bacillus cereus* produziu um biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial a 28 mNm^{-1} em meio de cultivo usando como substrato sacarose. Em 2005, Bento e colaboradores analisando populações microbianas de solo produtoras de biossurfactantes, identificaram um *Bacillus pumilus* capaz de reduzir a tensão superficial até 49 mNm^{-1}. Al-Wahaibi e colaboradores (2014) verificaram uma redução de tensão superficial idêntica (26,3 mNm^{-1}) no estudo realizado com *Bacillus subtilis* B30 em meio de cultivo suplementado com melaço.

Nesta pesquisa o melhor índice de emulsificação encontrado foi de 50%, verificado após 24 horas de fermentação, similar ao encontrado em nível de bancada (46,6%). Outros trabalhos também evidenciam boa emulsificação (50-60%) do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* com óleo diesel e tolueno (SLIVINSK et al., 2012; BENTO et al., 2005).

Baseado nas propriedades do biossurfactante produzido foi escolhido o tempo de fermentação de 24 horas para produção e aplicação em biorremediação de solo. Este tempo foi considerado viável uma vez que apresentou melhor índice de emulsificação e também uma excelente redução da tensão superficial (29 mNm^{-1}).

A concentração micelar crítica (CMC) é uma medida usada como um índice para avaliar a atividade do surfactante (FOX; BALA, 2000). Esta é definida como a concentração mínima de tenso-ativo necessário para atingir os menores valores de tensão superficial, a partir da qual começa a formação de agregados chamados micelas; a tensão superficial não diminui mesmo com a adição de mais biossurfactante (KIM et al., 2000; RON; ROSENBERG, 2001).

De acordo com Mulligan e colaboradores (2001) a eficiência do biossurfactante é medida por meio da CMC e esta varia de 0,001 a 2 g/L. A CMC obtida da produção com sacarose foi de 0,9 g/L demonstrando que a bactéria *Bacillus pumilus* é capaz de produzir um biossurfactante eficiente e com interessantes propriedades tenso-ativas.

A produção bruta de biossurfactante em escala ampliada após 24 horas de fermentação foi de 7 g/L; maior do que a produção em nível de bancada (5,1 g/L). Este dado pode explicar a maior redução da tensão superficial, uma vez que é uma medição direta da presença de biossurfactante no meio de cultivo. Além disso, no fermentador o pH e taxa de oxigênio foram controlados o que pode ter favorecido o crescimento do micro-organismo e a biossíntese do biopolímero (JOSHI et al., 2013).

Muitas aplicações de biossurfactantes requerem grande quantidade de produto, como, por exemplo, aplicações ambientais, assim estudos de ampliação de escala são necessários para otimização do processo (JOSHI et al., 2013). A produção de surfactantes microbianos em escala comercial ainda não foi completamente atingida devido aos baixos rendimentos e altos custos de produção (BEZERRA et al., 2012). Para isto, seria necessário que fossem produzidos e recuperados de forma mais barata e em grande escala.

O sucesso da produção dessas biomoléculas depende de muitas estratégias as quais envolvem desenvolvimento de processos mais baratos. O uso de resíduos agroindustriais é uma das alternativas viáveis, que além de reduzir os custos de produção reduzem a poluição resultante da disposição destes no ambiente. Além da sacarose, *B. pumilus* provou ser capaz de crescer e produzir biossurfactante em alguns meios alternativos como obtido neste trabalho a exemplo o melaço, manipueira e soro de queijo; e em trabalhos anteriores vinhaça e óleo residual de fritura (OLIVEIRA; GARCIA-CRUZ; 2013), podendo também serem estes resíduos usados para futuros estudos de ampliação de escala.

5.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO

O solo utilizado no processo de biorremediação, coletado no Estado de Puebla no México, é um solo agrícola contaminado por derramamento de petróleo em 2010.

Previamente à aplicação do biossurfactante para biorremediar o solo, foram analisadas algumas características físico-químicas para determinar o tipo de solo e a quantidade de nutrientes presentes. Os nutrientes são importantes para dar suporte ao desenvolvimento de micro-organismos nativos que favoreçam a biodegradação de hidrocarbonetos, além de melhorar a atividade do biossurfactante, Alguns autores relatam que a composição do solo pode influenciar na eficiência do surfactante durante a reabilitação deste (KHALLADI et al., 2009; CALVO et al., 2009; LEE et al., 2002).

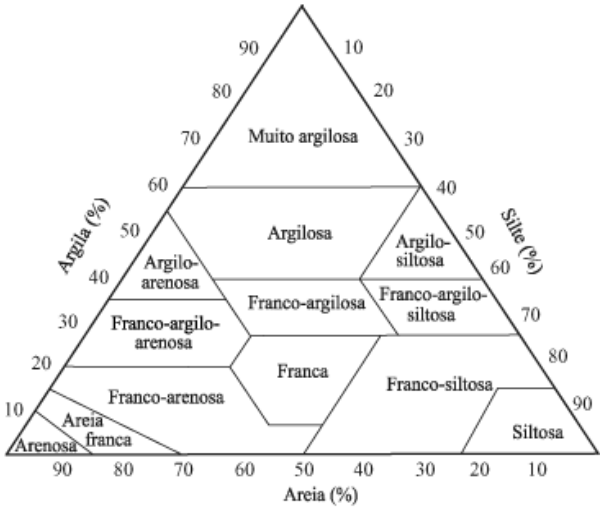
Os resultados das análises de nitrogênio, fósforo, matéria orgânica e pH do solo foram respectivamente: 0,0414%; 0,0%; 2,0%; e 6,14. Baseado nesta composição antes de iniciar o processo de biorremediação foi necessário fazer o ajuste de nutrientes na proporção C:N:P/100:10:1 com $NaNO_3$ para nitrogênio e K_2HPO_4 para fósforo. Em solos contaminados com petróleo, o principal obstáculo para biorremediação é o teor de carbono em excesso derivado da contaminação de hidrocarbonetos, o que afeta o balanço C:N:P (MARTÍNEZ-TOLEDO; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, 2013). No entanto, o teor de matéria orgânica e o pH do solo foram considerados suficientes para dar suporte ao processo de biorremediação.

Esse ajuste foi realizado com as análises repetidas depois de adicionado o caldo de cultivo livre de células na capacidade de campo de 30 e 50%, e CMC 0,9 e 1,8 g/L, uma vez que o caldo de cultivo poderia interferir nesse balanceamento porque apresenta concentrações de fósforo, nitrogênio e carbono presentes na formulação do meio de cultivo. O ajuste também foi realizado antes da aplicação do tergitol NP-10(surfactante sintético) no solo.

A caracterização da textura foi de franco-arenosa e foi dada de acordo com triângulo de texturas (Figura 21), apresentou % de silte + argila = 22%; % de areia = 78%; % de argila = 4% e % de silte = 18%.

Na formulação do caldo de cultivo para *B. pumilus* é utilizado óleo diesel, este fato agregou mais hidrocarbonetos aos sistemas. Sendo assim, foi verificado o inicial de HFM e HFP em cada condição testada.

Figura 21. Gráfico do triângulo de texturas, para denominação dos solos.



5.7 BIORREMEDIAÇÃO

5.7.1 Redução de hidrocarbonetos de fração média e fração pesada (HFM, HFP)

Foi verificado o potencial do biossurfactante produzido pela bactéria *B. pumilus* em biorremediar um solo contaminado com hidrocarbonetos. Em geral os biossurfactantes são moléculas capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de um meio líquido e de misturas de hidrocarbonetos, tornando-as agentes promissores para processos de biorremediação (BANAT et al., 2000). O petróleo é considerado uma mistura complexa de hidrocarbonetos de difícil remoção; neste estudo, foi analisada a ação do biossurfactante produzido pela bactéria *B. pumilus* na redução de hidrocarbonetos de fração média (HFM) e de hidrocarbonetos de fração pesada (HFP). De acordo com a Associação Global de Serviços Analíticos, os HFM compreendem aqueles de cadeia de C10-C28, e os HFP de C20-C35.

Com base nos estudos de variância (ANOVA) na capacidade de campo de 30% a concentração de areia teve interferência estatística positiva ($p<0,05$) nos dois tempos testados para reduzir HFM. Este resultado está associado com o fato dos sistemas com 4% de areia apresentarem maior porosidade em relação a 2%; afinal, as propriedades físicas dos solos influenciam o transporte de oxigênio e água necessários para os micro-organismos que mediam a degradação de hidrocarbonetos (ANDRADE et al., 2010). Calvo e colaboradores (2009) verificaram em ensaios experimentais que a adição de surfactante

em solo arenoso aumenta a retenção de umidade do solo ao longo do tempo favorecendo a biorremediação. A concentração de 1,8 g/L foi suficiente para reduzir 16,3% de HFM (Figura 22). Somente para 21 dias a CMC apresentou interferência estatística significativa ($p<0,05$).

Houve grande redução dos hidrocarbonetos de fração pesada, em 21 dias de tratamento verificou-se 95,6% de redução nas condições de 1,8 g/L de biossurfactante e 2% de areia (Figura 23). Estatisticamente a concentração de areia influenciou para a diminuição de HFP, porém a menor concentração de areia foi que favoreceu a redução do hidrocarboneto.

Quando analisada a capacidade de campo de 50%, ao contrário dos resultados observados para 30%, os HFM apresentaram boa redução de até 52% em 7 dias de tratamento (Figura 24). Outros trabalhos também relatam que para biorremediação de solos, a capacidade de campo maior (50 e 80%) geralmente é ótima para atividade microbiológica. (CALVO et al., 2009). De acordo com a análise de variância (ANOVA), a CMC foi estatisticamente significava em 7 dias. Em 21 dias não houve interferência significativa porque todos os resultados foram de 0% de redução.

Para HFP, em 50% da capacidade de campo foi observado o mesmo resultado estatístico da capacidade de campo de 30%. A concentração de areia interferiu estatisticamente, sendo que a menor concentração favoreceu a diminuição. Foi verificada redução de até 90,7% em 21 dias de tratamento (Figura 25). A redução de hidrocarbonetos de fração pesada foi bastante similar nos tempos de tratamentos de 7 e 21 dias.

Figura 22. Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração média (HFM) utilizando biossurfactante com 30% da capacidade de campo em 7 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação: 198,5894-59,2145*x-724859*y+28,7517*x*y+0).

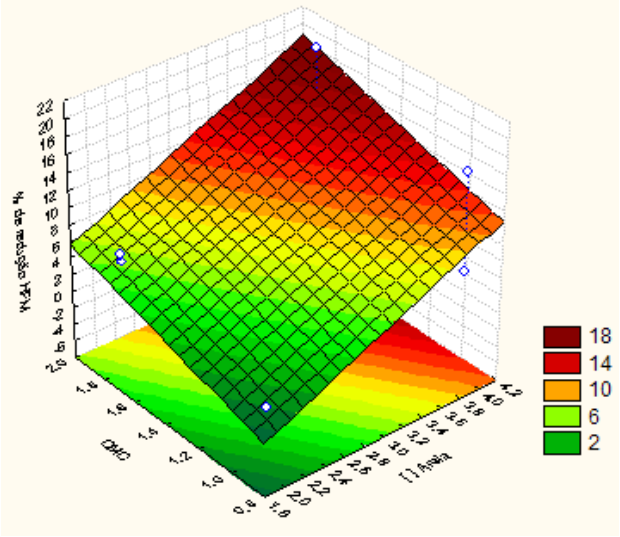


Figura 23. Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração pesada (HFP) utilizando biossurfactante com 30% da capacidade de campo em 21 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação: 80,3034-9,2023*x+41,8657*y-11,5654*x*y+0).

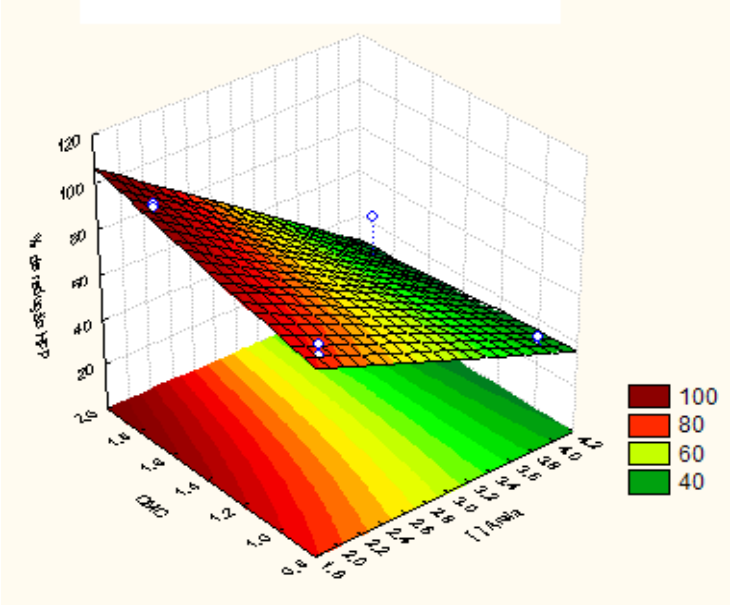


Figura 24. Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração média (HFM) utilizando biossurfactante com 50% da capacidade de campo em 7 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação: 117,1015-15,8767*x-59,8260*y+11,71110*x*y+0).

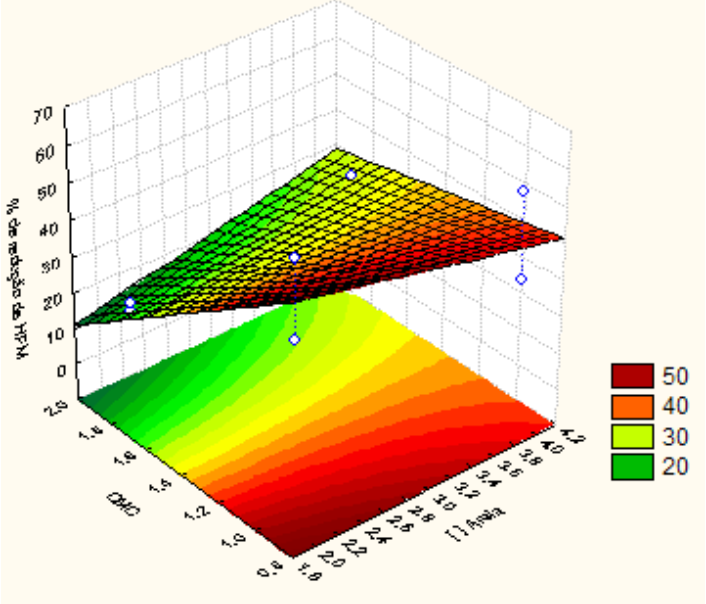
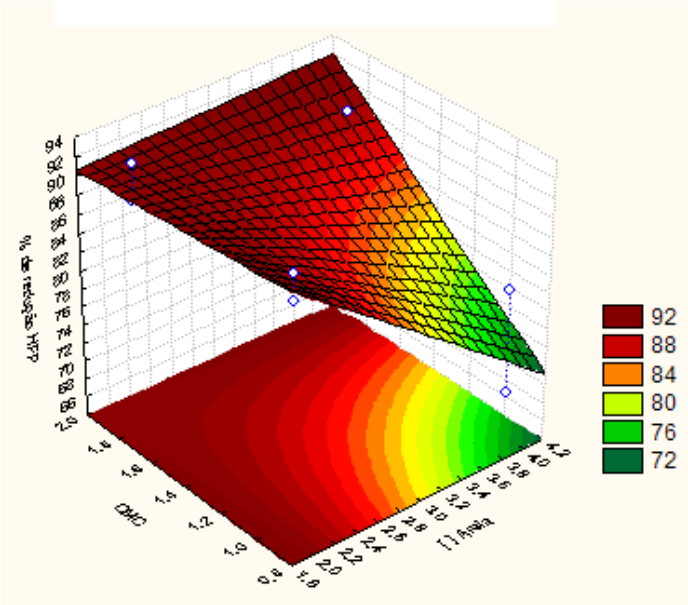


Figura 25. Superfície de resposta para % de redução de hidrocarboneto de fração pesada (HFP) utilizando biossurfactante com 50% da capacidade de campo em 21 dias de tratamento, ao redor dos valores ótimos de CMC (g/L) e concentração de areia (%) (equação:121,1955-15,2003*x-15,8534*y+7,9109*x*y+0).



Utilizou-se neste trabalho um surfactante sintético, tergitol (NP-10), a fim de comparar este com o surfactante biológico proveniente de *B. pumilus*, nas mesmas condições, na CMC e acima da CMC. Na capacidade de campo de 30%, o surfactante sintético foi melhor para redução de HFM, apresentando um resultado de até 38,9% de redução em 7 dias de tratamento, mas em comparação a 21 dias de tratamento os resultados foram similares ao biossurfactante produzido pela bactéria *B. pumilus*, reduzindo somente 7,5%. Estatisticamente em 7 dias nenhuma das variáveis foram significativas, e em 21 dias as variáveis concentração de areia e CMC foram significativas, sendo o melhor resultado observado em 4% de areia e 0,9 g/L do surfactante .

Em 7 dias a redução de HFP foi de 47,2% com o tergitol (NP-10) enquanto que com o biossurfactante testado foi de 66,7%, e em 21 dias 91,1% utilizando surfactante sintético foi verificado enquanto que com o polímero biológico 95,7%. Estatisticamente em 7 dias não houve interferência estatística de nenhuma das variáveis e em 21 dias houve interferência da CMC e concentração de areia.

O surfactante sintético também foi analisado quanto à capacidade de campo de 50%. De acordo com a análise de variância (ANOVA), em 7 e 21 dias houve interferência significativa da concentração de areia e CMC para redução de HFP e HFM. Nesta capacidade de campo a redução de HFM foi de até 9% em 7 dias e 5,3 % em 21 dias de tratamento. De acordo com estes resultados o biopolímero produzido por *B. pumilus* favoreceu melhor redução de HFM, reduzindo em até 52,5% em 7 dias.

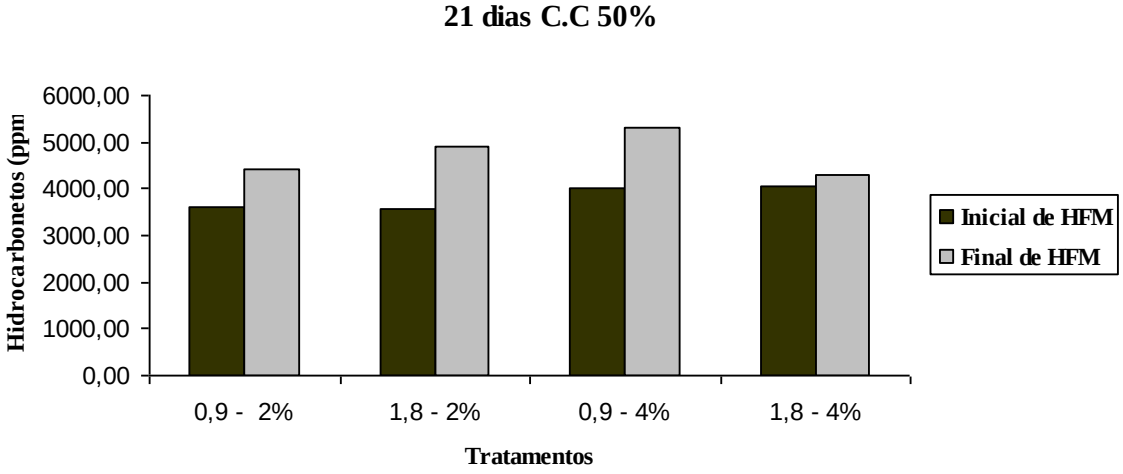
Com os resultados de HFP não foi diferente, a percentagem de redução foi menor com tergitol (NP-10) em sua CMC que quando usado o biossurfactante, em 7 dias foi observado 76,4% enquanto que 93,38% usando biossurfactante; e em 21 dias 83,6% usando o surfactante sintético e 90,77% usando o biológico.

Os dados de comparação entre o surfactante sintético e o biológico são importantes porque, apesar da CMC do tergitol (NP-10) ser menor que a do biossurfactante (55 mg/L), os resultados demonstraram que o uso deste biopolímero pode ser uma alternativa viável para aplicação ambiental, e talvez, mais econômica, caso seja produzido utilizando resíduos e otimizando as condições de produção.

Observou-se neste trabalho que, no geral, o biossurfactante produzido foi melhor para reduzir hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) do que os hidrocarbonetos de fração média (HFM) nas duas capacidades de campo testadas (30 e 50%) nos tempos de 7 dias e

21 dias. Também foi verificado que em alguns tratamentos houve aumento dos HFM em relação à concentração inicial, obtendo 0% de redução. (Figura 26).

Figura 26. Determinação de hidrocarbonetos de fração média (HFM) nos sistemas com biossurfactante na capacidade de campo de 50% após 21 dias de biorremediação.



Os resultados obtidos sugerem que os HFP foram fragmentados a HFM durante o processo de biorremediação. Rodríguez-Vázquez em 2010 verificou o mesmo comportamento de aumento de HFM durante uma biorremediação de 35.000 m^3 de solo argiloso contaminado com hidrocarbonetos. No entanto, ainda não se tem uma explicação científica do porque os micro-organismos atacam primeiro as cadeias mais longas e depois as cadeias mais curtas. Mas isto também acontece com a celulose contida em materiais lignocelulósicos (como bagaços; madeira, etc.) aonde durante o processo de sacarificação observa-se quebra das cadeias longas transformando-as em curtas pela ação de exoglucanases e depois pelas endoglucanases (HOSSEINI; SHAH, 2011).

As enzimas também são importantes para a velocidade de degradação do hidrocarboneto. Essa degradação é comumente dependente da concentração do contaminante e da quantidade de catalisadores presentes e, de certa forma, representa o número de micro-organismos capazes de metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula (ANDRADE et al., 2010). Uma grande variedade de fatores metabólicos e fisiológicos é requerida para degradação de diversos compostos de hidrocarbonetos. No entanto, todas estas propriedades não são encontradas em um organismo (BENTO et al., 2005).

Foram realizadas análises de HFM e HFP utilizando controles não contendo o biopolímero, a fim de examinar como o sistema se comporta naturalmente. Observou-se que nas duas capacidades de campo testadas houve redução dos hidrocarbonetos, porém em menor quantidade comparada com os tratamentos contendo agentes tenso-ativos; as porcentagens de redução máxima encontradas nos controles foram de 14% de HFM no solo puro e de 32% de HFP no controle de 4% de areia. A percentagem de saturação do solo e a concentração de areia também foram condições que interferiram para a redução de hidrocarbonetos.

A redução de hidrocarbonetos nos controles evidencia um processo natural que acontece no meio ambiente, características físicas do solo, bem como os micro-organismos presentes no sistema, por si só podem ser capazes de degradar substâncias recalcitrantes. Porém, foi demonstrado que o uso de biossurfactante aumentou a eficiência de degradação dos compostos em todos os parâmetros testados, uma vez que os biossurfactantes apresentam a capacidade de mobilizar e solubilizar hidrocarbonetos por meio da redução da tensão superficial nas interfaces das fases orgânica - solo e orgânica - água (CHU; CHAN, 2003).

Em todos os sistemas foi verificado consumo dos nutrientes, e a necessidade de reposição foi baseada no comportamento respiratório (item 5.6.2). Esse fato foi importante uma vez que indicou que os sistemas estavam trabalhando para a remoção dos hidrocarbonetos, ou seja, os micro-organismos utilizaram os nutrientes para crescimento. Optou-se por fazer o ajuste após 15 dias de tratamento. O fósforo foi o nutriente mais consumido, uma média de 50% em 30% da capacidade de campo e 60% na capacidade de campo 50%. O nitrogênio também foi bastante consumido havendo a necessidade de reposição em quase todos os tratamentos, o maior consumo foi de 40%. O ajuste de nutrientes durante o processo foi um fator determinante, pois promoveu suporte para que o processo ocorresse.

5.7.2 Determinação do CO_2

A cada 3 dias foi verificada a concentração de CO_2 presente nos microcosmos por meio de cromatografia gasosa e realizada a posterior aeração injetando ar úmido por meio de agulhas. (Figura 27).

Figura 27. (a) Fotografia do cromatógrafo (Gow Mac) utilizado na determinação de CO_2; (b) fotografia dos sistemas no processo de aeração por agulhas.



(a) (b)

A taxa de biodegradação de hidrocarbonetos é com freqüência estimada baseada no consumo de oxigênio ou de produção de dióxido de carbono. A eficiência da biorremediação é uma função da capacidade dos degradadores microbianos em permanecerem ativos no ambiente (ALEXANDER, 1999). Neste trabalho, a respiração microbiana foi descrita como produção de CO_2. A evolução do CO_2 foi reportada em miligramas de CO_2 por gramas de solo (mg CO_2/g). A respiração microbiana foi quantificada nas primeiras 24 horas e a cada 3 dias para todas as unidades experimentais; no total foram realizadas 6 leituras.

A máxima produção de CO_2 nos tratamentos com biossurfactante na capacidade de campo de 30% foi observada entre os dias 4 e 7, neste período a respiração dos micro-organismos presentes no sistema foi alta, sugerindo alta atividade de biorremediação. A Figura 28 mostra a evolução de CO_2 em todos os parâmetros incluindo os controles. Houve uma relação direta entre a redução de hidrocarboneto e a produção de CO_2. Uma das maiores reduções de hidrocarbonetos foi observada no microcosmo de 1,8 g/L com 2% de areia, o mesmo foi verificado observando o nível de CO_2.

No 15º dia foi realizado o ajuste da relação C:N:P nos sistemas; porém, não foi observado o aumento imediato da produção de CO_2 na leitura seguinte. Isso se deve ao fato dos micro-organismos necessitarem de um tempo para adaptação ao novo sistema, além de que o esgotamento de nutrientes pode ter favorecido a inibição e morte celular; no entanto, em 21 dias foram verificadas excelentes reduções de HFP (95,6%; 78,7%) o que sugere que os sistemas voltaram a respirar e o ajuste de nutrientes foi positivo. Roldan-martín e

colaboradores (2007), em estudos de biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos, verificaram morte celular em contagem de bactérias e fungos após o 15º dia, considerando escassez de nutrientes a partir desse dia.

Comparando os controles com os tratamentos do planejamento estatístico, em todos os controles foi observada baixa quantidade de CO_2 (Figura 28), comprovando que quando o biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* está presente aumenta a respiração e conseqüentemente a produção de CO_2 no sistema, isto porque dá suporte para o crescimento celular aumentando a solubilidade e mobilidade de compostos tais como os hidrocarbonetos. É comprovado que a baixa população microbiana e a baixa diversidade microbiológica também afetam a eficiência da biodegradação (ALEXANDER, 1999; TA-CHEN et al., 2010). Nesta pesquisa houve uma relação direta entre produção de CO_2 e redução de hidrocarbonetos, uma vez que, foi observada baixa redução de HFM e HFP nos controles.

A biorremediação de hidrocarbonetos pelo biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* foi mais efetiva quando usado na capacidade de campo de 50%. O mesmo foi observado analisando a produção de CO_2, onde foram verificados valores mais altos nos 10 primeiros dias de biorremediação (Figura 29). A máxima produção de CO_2 foi observada no 7º dia (0,78 mg de CO_2/g de solo) no mesmo tratamento onde foi verificado maior remoção de HFP (93,3%), indicando uma relação direta entre biorremediação e produção de CO_2. O controle com 2% de areia teve um leve aumento da produção de CO_2 entre o 7º e o 13º dia, com uma máxima de 0,16 mg de CO_2/g de solo. Isso se deve ao fato de uma maior capacidade de campo ser favorável à atividade microbiológica.

Após 21 dias foi observado crescimento microbiano visível em todos os tratamentos (Figura 30). A observação visual da presença de micro-organismos confirma a capacidade dos sistemas testados em promover crescimento e conseqüentemente biodegradação dos poluentes presentes.

Quando utilizado o tergitol NP-10, nas duas capacidades de campo testadas, a produção de CO_2 foi abaixo de 0,03 mg de CO_2/g de solo, 23 vezes menor que a concentração de CO_2 verificada no solo com biossurfactante. Nestes experimentos não houve relação direta entre a concentração de CO_2 presente no sistema e a remoção de hidrocarbonetos; possivelmente, isto pode ter sido em decorrência das características químicas do surfactante sintético que agiu diretamente nas moléculas do hidrocarboneto e

as degradou ou não as disponibilizou para serem utilizadas como fontes de carbono pelos micro-organismos presentes nos microcosmos.

Figura 28. Produção de CO_2 durante a remoção de hidrocarbonetos de fração média (HFM) e de hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) de um solo com 30% da capacidade de campo em diferentes tratamentos com o biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus*. (0,9-1,8 g/L de biossurfactante/% 2-4 de areia), (C=controles 2-4% de areia).

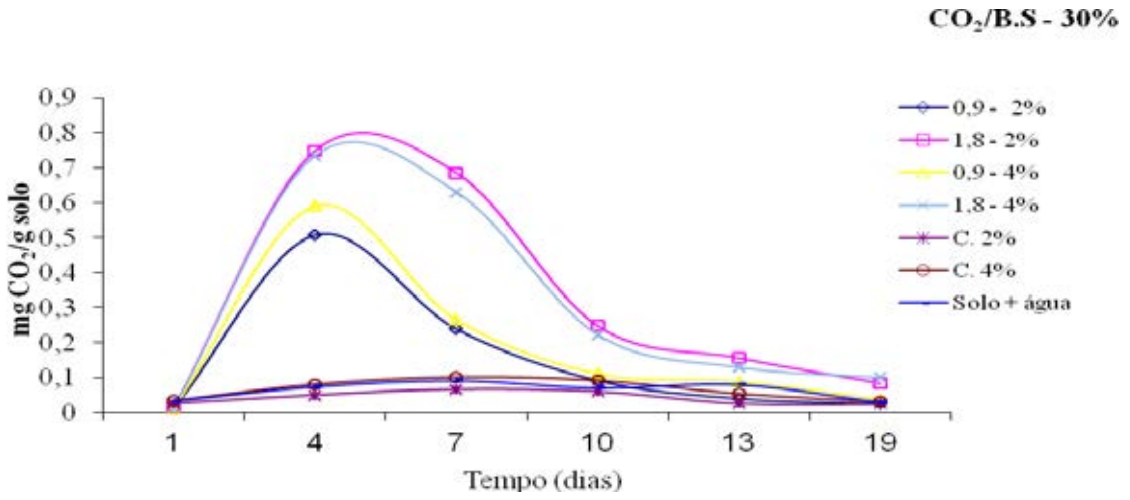


Figura 29. Produção de CO_2 durante a remoção de hidrocarbonetos de fração média (HFM) e de hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) de um solo com 50% da capacidade de campo em diferentes tratamentos com o biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus*. (0,9-1,8 g/L de biossurfactante/% 2-4 de areia), (C=controles 2-4% de areia).

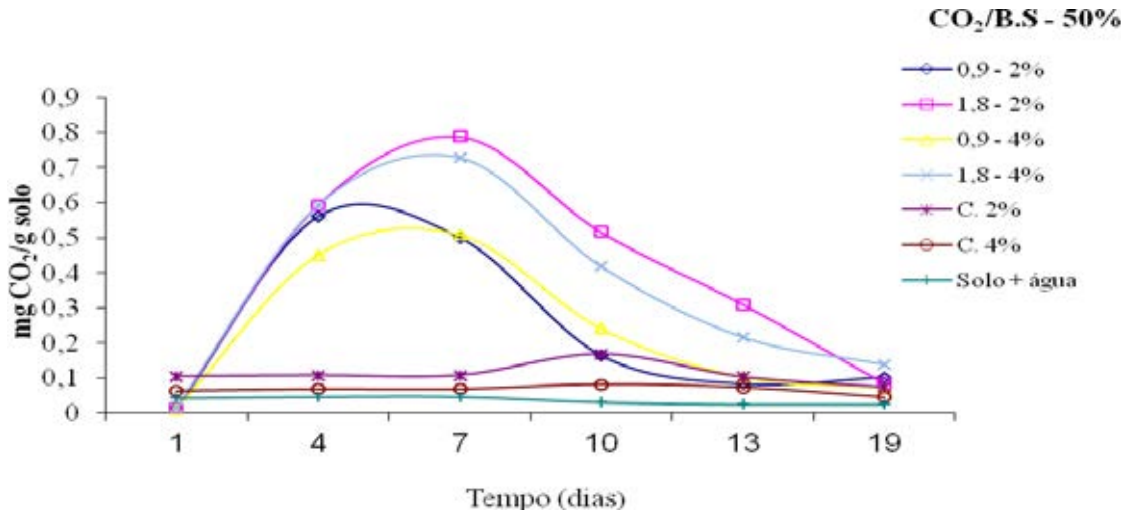
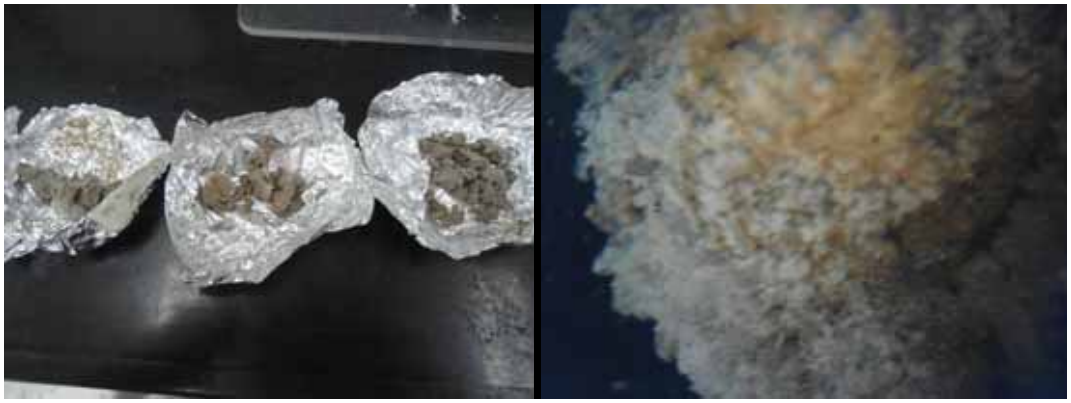


Figura 30. Crescimento microbiano visível no solo contendo biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus* na capacidade de campo de 50%. (a) visão em folhas de alumínio; (b) visão no microscópio óptico.



(a) **(b)**

6. CONCLUSÕES

Os substratos manipueira, melaço, soro de queijo, e sacarose, provaram ser boas fontes alternativas para o crescimento microbiano e biossíntese de biossurfactante pela bactéria *Bacillus pumilus*.

Dentro das condições estudadas, foi possível verificar melhores parâmetros para a produção de biossurfactante frente concentrações do substrato, tempo de incubação, temperatura de incubação e agitação do meio de cultivo em todos os substratos analisados.

O biossurfactante produzido com todos os substratos testados foi capaz de reduzir a tensão superficial, sendo as melhores reduções de 56% (32 mNm^{-1}) e 49% (37 mNm^{-1}) observadas quando utilizado sacarose e melaço, respectivamente.

O biossurfactante produzido com todos os substratos foi capaz de formar emulsões com tolueno e óleo de soja, apresentando altos índices de emulsificação de até 50%.

A maior produção de biossurfactante bruto (5,1 g/L) ocorreu com o substrato sacarose. Entretanto, o uso de manipueira, melaço e soro de queijo demonstrou ser eficiente produzindo 1,12; 0,35 e 1,4 g/L, respectivamente.

O biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus pumilus* com todos os substratos testados foi estável às mudanças de temperaturas, variação de pH e de salinidade.

A bactéria *Bacillus pumilus* foi capaz de crescer e produzir biossurfactante utilizando sacarose como substrato em escala ampliada (2L) com interessantes propriedades tenso-ativas: redução da tensão superficial de até 26,3 mNm^{-1}, índice de emulsificação de até 50% e CMC 0,9 g/L. A produção bruta de biossurfactante em escala ampliada (7 g/L), foi maior quando comparada com a produção em nível de bancada (5,1 g/L).

O biossurfactante produzido em escala ampliada promoveu biorremediação de um solo agrícola contaminado com petróleo, reduzindo até 95,6% de hidrocarbonetos de fração pesada (HFP) e 52% de hidrocarbonetos de fração média (HFM).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, H. et al. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 113, n. 2, p. 211-219, 2012.

ABRAHAM, W. R. Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borkumensis*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Oklahoma, v. 1393, n. 1, p. 57-62, 1998.

AL-BAHRY, S. N. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barkin, v. 81, n. 3, p. 1-6, 2012.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1999.

AL-WAHAIBI, Y. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application inenhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdan, v. 114, n. 1, p. 324-333, 2014.

ALY, S. M. et al. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. **Aquaculture**, London, v. 277, n. 1-2, p. 1-6, 2008.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, Marília, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

AOYAMA, M. et al. Soybean-milk-coagulating activity of *Bacillus pumilus* derives from a serine proteinase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 4, p. 390-395, 2000.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, H.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 95, p. 23-29, 2012.

ARAGÃO, V. O. et al. Leveduras degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 57., 2007, Fortaleza. **Anais**... Fortaleza, 2007.

ARAÚJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 1, p. 481-488, 2011.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G**.** Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.

ASFÇE, Y.; NURBASF, M.; AÇEKEL, Y. S. Removal of zinc ions from a soil component Na-feldspar by a rhamnolipid biosurfactant. **Desalination**, Amsterdam, v. 223, n. 1-3, p. 361-365, 2008.

ASSOCIAÇÃO Global de Estudos Analíticos. Disponível em: <http://www.caslab.com/Petroleum-Hydrocarbon-Ranges/>. Acesso em dia: 10/10/2014.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barkin, v. 35, n. 1-3, p. 317-327, 1995.

AYOTAMUNO, J. M.; KOGHARA, R. B.; TALEAT, M. O. Bioremediation of a petroleum hydrocarbon polluted agricultural soil at different levels of water application in Port Harcourt, Nigeria. **Journal of Food, Agriculture and Environmental**, Helsinki, v. 4, n. 3-4, p. 214-217, 2006.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 495-508, 2000.

BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. 2000. 95 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. F. Produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi). In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., 2007, João Pessoa. **Anais**... João Pessoa, 2007.

BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais, para aplicação em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BATISTA, S. B. et al. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 187-194, 2006.

BEDNARSKI, W. et al. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, Essex, v. 95, n. 1, p. 15-18, 2004.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.

BENTO. F. M. et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, Jena, v. 160, n. 3, p. 249-255, 2005.

BEZERRA, M. S. et al. Produção de biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2012.

BHARALI, P. et al. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barkin, v. 65, n. 5, p. 682-690, 2011.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 231-236, 1999.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3280-3287, 2003.

BOUCHEZ, N. M. et al. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 421-428, 1999.

BOUYOUCOS, G. J. The hydrometer method improved for the mechanical analysis of soil. **Soil Science**, Madison, v. 23, n. 2, p. 343-353, 1927.

BRINT, J. M.; OHMAN, D. E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 4, p. 7155-7163, 1995.

BROPHY, P. F.; KNOOP, F. C. *Bacillus pumilus* in the induction of clindamycin-associated enterocolitis in guinea pigs. **Infection and Immunity**, Washington, v. 35, n. 1, p. 289-295, 1982.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 86 f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

CALVO, C. et al. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CHAKRABARTY, A. M. Genetically manipulated microorganisms and their products in the oil service industries. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 32-36, 1985.

CHEN, J. et al. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 112, n. 4, p. 660-671, 2012.

CHO, K. M. et al. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 402-406, 2009.

CHU, W.; CHAN, K. The mechanism of the surfactant aided washing for hydrophobic soil and partial hydrophobic organics. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 307, n. 1, p. 83-92, 2003.

COOKSON, J. T. **Bioremediation engineering**: design and application. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 205-258.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Proccess Biochemistry**, London, v. 45, n. 9, p. 1511-1516, 2010.

CZAPLICKA, M.; CHMIELARZ, A. Application of biosurfactants and non-ionic surfactants for removal of organic matter from metallurgical lead-bearing slime. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 2, p. 645-649, 2009.

DARVISHI, P. et al. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by na efficient microbial consortium, ERCPPI-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 292-300, 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, A. K.; SEN, R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. **Colloids Surface B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 183-186, 2009.

DASTGHEIB, S. M. M. et al. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 30, p. 263-270, 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 4, p. 499-504, 2009.

DEL BIANCHI, V. **Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do estado de São Paulo.** 1998. 118 f. Tese (Doutorado)–Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 7, n. 6-7, p. 641-646, 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbal production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, n. 1, p. 47-64. 1997.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 61-69, 2001.

DUBEY, K. V. et al. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanesis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 126, n. 2, p. 368-374, 2012.

DWARAKANATH, V. et al. Anionic surfactant remediation of contaminated soil columns by nonaqueous phase liquids. **Journal of Contaminant Hydrology**, Amsterdam, v. 38, n. 38, p. 465-488, 1999.

FATHABAD, E. G. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**, New York, v. 1, n. 1, p. 58-69, 2011.

FERNANDES, P. A. V. et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* r14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 704-709, 2007.

FERREIRA, L. C. **Aspectos microbiológicos da conservação de polpas de pequi (Caryocar brasiliense Camb.): Qualidade, higiene, adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microrganismos com potencial para bioconservação**. 2000. 110 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, p. 208-217, 1992.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, Essex, v. 75, n. 3, p. 235-240, 2000.

FUKUOKA, T. et al. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 343, n. 3, p. 555-560, 2008.

GEORGIOU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 10, n. 1, p. 60-65, 1992.

GHOJAVAND, H. et al. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science** , New York, v. 324, n. 2, p. 172-176, 2008.

GHRIBI, D. et al. Evaluation of larvicidal potency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 48, p. 68-72, 2012.

GOLVEIA, E. R. et al. Bactérias produtoras de biossurfactantes - produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 30, p. 39-45, 2003.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 298-304, 2010.

HELVACI, S. S.; PECKER, S.; OZDEMIR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 35, n. 1-3, p. 225-233, 2004.

HOLMBERG, K. Natural Surfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Gotemburg, v. 6, p. 148-159, 2001.

HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 107-119, 1990.

HOSSEINI, S. A.; SHAH, N. Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 3841-3848, 2011.

HOULT, B.; TUXFORD, A. F. Toxin production by *Bacillus pumilus*. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 455-458, 1991.

HUA, Z. et al. Influence of biosurfactants produced by *Candida Antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, New York, v. 37, n. 17, p. 4143-4150, 2003.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 176-179, 1995.

IRIE, Y.; OTOLLE, G. A.; YUK, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 250, n. 2, p. 237-243, 2005.

JAIN, R. M. et al. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, n. 3, p. 2320-2326, 2012.

JOO, H. J. et al. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulate* and food waste. **Environmental Pollution**, Barking, v. 156, n. 3, p. 891-896, 2008.

JOSHI, S. et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 1, p. 195-199, 2008.

JOSHI, S. et al. Optimization of Bench-Scale Production of Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* R2. **APCBEE PROCEDIA**, Amsterdam, v. 5, p. 232-236, 2013.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4603-4608, 2007.

JUWARKAR, A. A. et al. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, n. 10, p. 1996-2002, 2007.

KALOGIANNIS, S. et al. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 2, p. 249-256, 2003.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis* **Molecular Microbiology**, Salem, v. 49, n. 3, p. 581-590, 2003.

KHALLADI, R. et al. Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. **Jounal of Hazardous Materials**, Amsterdam v. 164, n. 2-3, p. 1179-1184, 2009.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 367, n. 1, p. 311-318, 2012.

KIM, S. H. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 21, n. 3, p. 249-253, 2000.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 7, p. 2389-2396, 2010.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

KOCH, A. K. et al. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 13, p. 4212-4219, 1991.

LAI, C. C. et al. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 167, n. 1-3, p. 609-614, 2009.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, New York, v. 7, n. 1, p. 12-20, 2002.

LAZARIDOU, A. et al. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 1, p. 122-132, 2002.

LEE, D. H. et al. Effect of soil texture on surfactant-based hydrophobic organic remediation of contaminated soil. **Environment International**, New York, v. 27, n. 8, p. 681-688, 2002.

LEE, S. C. et al. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp.Y6-1 isolated from waste soybean oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 7, p. 2288-2292, 2008.

LIN, S. C. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 109-120, 1996.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, Guildford, v. 29, n. 1, p. 138-142, 2012.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon source–a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, New York, v. 2, n. 2, p. 237-241, 1999.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.

MANEERAT, S. Biosurfactants from marine microorganisms. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkhla, v. 27, n. 6, p. 1263-1272, 2005.

MARTÍNEZ-TOLEDO, A.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. *In situ* biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 595-605, 2013.

MÉXICO. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles en hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. **Diario Oficial de la Federación**, Ciudad de México, 29 marzo 2005.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, Amsterdam, v. 60, n. 1-4, p. 371-380, 2001.

MUÑOZ-INIESTRA, D. J. et al. **Manual de métodos de análisis de suelos**. México: UNAM, 2000.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, Bangalore, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NAJAFI, A. R. et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 163, n. 3, p. 188-194, 2010.

NEVES, E. et al. Biosurfactants. **Environment International**, New York, v. 30, p. 50-62, 2004.

NGUYEN, T. T. et al. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, New York, v. 42, n. 6, p. 1735-1743, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 112, p. 163-172, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

OLIVEIRA, J. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 1, p. 155-160, 2013.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2.

ORGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2007.

OTTO, R. T. et al. Production of sophorolipids from whey II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 495-501, 1999.

ÖZDEMIR, G.; MALAYOGLU, U. Wetting characteristics of aqueous rhamnolipids solutions. **Colloids Surface B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 39, p. 1-7, 2004a.

ÖZDEMIR, G.; PEKER, S.; HELVACI, S. S. Effect of pH on the surface and interfacial behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids Surface. A: Physicochemical Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 234, n. 1-3, p. 135-143, 2004b.

PARKINSON, M. Bio-surfactants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 3, n. 1, p. 65-83, 1985.

PATEL, R.; DESAI, A. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 91-94, 1997.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 553-563, 1999.

POMSUNTHORNTAWEE, O. et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 2, p. 812-818, 2009.

POORNA, C. A.; PREMA, P. Production and partial characterization of endoxilanase *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 106-112, 2006.

PRIETO, L. M. et al. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n. 9, p. 1781-1785, 2008.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evalutions of paraffins biodegradation and biossurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 1-10, 2003.

RODRIGUES, L. R. et al. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. **Applied and Environment Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4408-4410, 2004.

RODRIGUES, L. R; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bactéria. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 135-142, 2006a.

RODRIGUES, L. R. et al. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 135-142, 2006b.

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. **Reporte técnico "Pruebas de tratabilidad para la remediación de lodos de perforación"**. 2010. Reporte Final Contrato GPA-01-2008 PEMEX-CINVESTAV.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

RONDÁN-MARTÍN, A. et al. Solid culture amended with small amounts of raw coffee beans for the removal of petroleum hydrocarbon from weathered contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 60, n. 1, p. 35-39, 2007.

ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbon**:** new markets. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 419-424, 1993.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low molecular mass microbial surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

SANTOS, C. F. C. et al. Produção de biosurfactante por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Boletim do SBCTA**, Campinas, v. 33, n. 2, p. 157-161, 1999.

SANTOS, F. K. G. et al. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4., 2007, Campinas. **Anais**... Campinas, 2007.

SANTOS, S. C. et al. Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 9, n. 35, p. 5704-5711, 2010.

SCHRAMM, L. L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G. Surfactants and their applications. **Annual Reports Section "C"**, New York, v. 99, n. 2, p. 3-48, 2003.

SHAVANDI, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, Rhodococcus sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 477-482, 2011.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.

SILVA, A. N. **Produção otimizada de alginato e plástico biodegradável (polihidroxibutirato) por *Azotobacter vinelandii***. 2009. 112 f. Tese (Doutorado)– Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2009.

SINGH, A.; HAMME, J. D.; WARD, O. P. Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment. Biosurfactants and biotechnology**. Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 1, p. 99-122, 2007.

SLIVINSKI, C. T. et al. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, London, v. 47, n. 12, p. 1848-1855, 2012.

SOUZA SOBRINHO, H. B. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2008.

TA-CHEN, L.; PO-TSEN, P.; SHENG-SHUNG, C. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Material**, Amsterdam, v. 176, n. 1-3, p. 27-34, 2010.

TRAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 3, p. 3366-3372, 2011.

VAN DELDEN, D. et al. Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 9, p. 4499-4502, 1998.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants **Biotechnology Advances**, New York, v. 9, n. 2, p. 241-252, 1991.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

VOLLENBROICH, D. et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, London, v. 25, n. 3, p. 289-297, 1997.

WEBER, L. et al. Elucidation of the structure of an unusual cyclic glycolipid from *Torulopsis apicola*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 206, n. 1, p. 13-19, 1990.

WEI,Y. H.; CHOU, J. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 146-154, 2005.

WHANG, L. M. et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 155-163, 2008.

YAKIMOV, M. M. et al. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. **International Journal Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 2, p. 339-348, 1998.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, New York, v. 21, n. 4, p. 1329-1334, 2005.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZOUBOULIS, A. I. et al. The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. **Minerals Engineering**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 1231-1236, 2003.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, _____/_____/____

_____
Assinatura