

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL

**ESTUDO DE UM BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR
ESPÉCIES DE *BACILLUS* ISOLADAS DE ÁGUA DO MAR E
SEU POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO**

Recife

2017

ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL

**ESTUDO DE UM BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR
ESPÉCIES DE *BACILLUS* ISOLADAS DE ÁGUA DO MAR
E SEU POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof^a Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Co-orientador: Dra. Raquel Diniz Rufino

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Durval, Italo José Batista

Estudo de um biossurfactante produzido por espécies de *Bacillus* isoladas de água do mar e seu potencial para biorremediação de derramamento de petróleo / Italo José Batista Durval. – Recife: O Autor, 2017.

93 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Leonie Asfora Sarubbo

Coorientadora: Raquel Diniz Rufino

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências

- 1.** Biodegradação 2. Biossurfactantes 3. Bacillus (bactéria) I. Sarubbo, Leonie Asfora (orient.) II. Rufino, Raquel Diniz (coorient.) III. Título

620.11223

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-311

ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL

**ESTUDO DE UM BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR
ESPÉCIES DE *BACILLUS* ISOLADAS DE ÁGUA DO MAR
E SEU POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 23/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco

Dra. Ester Ribeiro Gouveia
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Juliana Moura de Luna
Universidade Católica de Pernambuco

Recife, 23 de fevereiro de 2017.

Aos meus pais, Waldemar e Irlene por toda dedicação e esforço em prol da minha formação moral e intelectual.

As minhas avós, madrinha e padrinho por contribuírem com valores éticos e morais e o apoio em cada etapa da minha vida.

Aos meus amigos, por me apoiarem, incentivarem e compreenderem sempre.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de certa forma contribuíram para este momento da minha vida.

Gostaria de expressar minha gratidão à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Departamento de Antibióticos e a todos os funcionários responsáveis pela organização e estruturação dessa instituição. Obrigado a CAPES/CNPq, por fornecer o suporte financeiro mensal, a bolsa, no ultimo ano, propiciando a execução mais tranquila deste projeto.

Agradeço ao Laboratório de Bioengenharia do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI) por fornecerem a estrutura e condições necessárias para o desenvolvimento deste projeto.

Sou eternamente grato à professora doutora Leonie Asfora Sarubbo pela confiança ao abrir as portas, anos atrás, para um graduando que só pretendia desenvolver um projeto de monografia e hoje se encaminha para finalizar um mestrado. Agradeço pela persistência em me fazer seguir esse caminho, e por confiar mais em mim, do que eu mesmo, muitas vezes. Seus conselhos, eu levarei para a vida. Ter tido o prazer de cruzar o seu caminho, e permanecer nele, faz de mim um afortunado. Então, obrigado pelos puxões de orelha, ensinamentos, e principalmente, por não desistir de mim.

Sorte pelo jeito não me falta, pois pude contar nessa trajetória, também, com a presença, constante e incansável da doutora Raquel Diniz Rufino, que nos protocolos consta como minha co-orientadora, mas foi além. Incansável na luta diária de fazer deste que escreve um mestre. Os contratempos existiram, estresses ocorreram, a vida deu suas rasteiras, mas ela sempre esteve lá, pronta pra ajudar e disposta a compreender. Obrigado.

Muitas outras pessoas direta ou indiretamente ajudaram para a realização desse projeto, destacando a doutora Juliana Moura de Luna, e os doutorandos Darne Almeida, Rita de Cássia e Fabiola Almeida, além do mestrando Pedro Brasileiro, que mostraram o caminho para realização dos experimentos.

Agradeço aos membros do Laboratório de Bioengenharia do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, o GRUPO

BIOSSURFACTANTES, em especial a Ana Helena, Maria Isabel (Bel), Víviann Ribeiro, Iverson Silva, Hugo Morais, Isabela Natália, Bruno Galdino, Bruno Cabral, Nathália Padilha, Elias José e Marcos Chaprão por me socorrem quando tive dúvidas ou precisei de suporte em experimentos, a todos, meu muito obrigado.

Agradeço aos meus companheiros de curso, em especial meus parceiros desde o início, meus amigões, Raphael Andrade (Rapha) e Henrique Telles (Rique), além da minha querida Káren Oliveira, pessoas que tive o prazer de conviver para além do ambiente acadêmico, e que levo para a vida, fundamentais para não desistir nos momentos mais complicados.

Agradeço aos meus amigos, para todas as horas, que me acompanham desde o colégio (Mirella Wanderley, Suélica Lima, Fernando Vicente, Juliana Picanço, Cláudio Antônio, Carlos Reis, Maria Eduarda Gayoso, Vinicius Fuchs, Rafael Vieira, Luana Pradines, Jorge Alcântara e Joana Guiro), nossa amizade é para sempre, obrigado pelo ombro amigo e a força para que eu não desistisse. Aos meus novos/velhos amigos (Marialua Fabisak, Leonardo Marinho, Natália Ramos e Cauê Castro), obrigado por patrocinarem, literalmente, momentos de desopilação, quando as coisas não estavam fáceis.

Por fim agradeço a minha família, o meu porto seguro, graças a vocês nunca me senti desprotegido ou sozinho, foram os responsáveis por grande parte do que sou hoje, estavam comigo em cada conquista, e a vocês dedico mais essa vitória.

“Ontem passou. Não precisa lembrar.
Amanhã não chegou. Não precisa gritar.
Vamos viver. O aqui, agora. Não precisa
jogar fora.”

(Provérbio iraniano)

RESUMO

Derramamentos de petróleo representam um perigo permanente para o desenvolvimento mundial. Métodos de limpeza e remediação são fundamentais para evitar a intoxicação e a morte de organismos vivos após desastres com hidrocarbonetos. Os biossurfactantes são anfipáticos e reduzem as tensões superficiais e interfaciais para melhorar a mistura de duas fases imiscíveis. Esses compostos naturais têm menos toxicidade, mais biodegradabilidade e estabilidade sob condições ambientais adversas em comparação com surfactantes químicos. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo isolar uma bactéria produtora de biossurfactante e caracterizar-lo para aplicação na bioremediação de ambientes marinhos. As bactérias produtoras de biossurfactantes foram isoladas de amostras de água do mar e identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*. As bactérias foram cultivadas com diferentes fontes de carbono (glicose, óleo de soja e óleo de fritura de soja) e nitrogênio (cloreto de amônio, nitrato de sódio, ureia e peptona). O isolado *Bacillus* sp. apresentou os resultados mais promissores para produção de biossurfactante, sendo cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo de fritura e 0,12% de peptona. Após a avaliação da agitação e do tempo de cultivo, foram selecionadas as condições: 250 rpm e 48 horas. Nestas condições, a tensão superficial foi reduzida para 27 mN/m, a interfacial para 6 mN/m e a produção de biossurfactante foi de 3,5 g/L. O aumento de escala foi realizado em biorreatores, tendo como resultados: tensões superficiais de 28,7; 27,5 e 32 mN/m e rendimentos de 4,3; 4,6 e 4,1 g/L para biorreatores de 1,2 ; 3 e 50 L, respectivamente. O biossurfactante foi caracterizado como um lipopeptídeo aniônico com CMC de 500 mg/L. O tensoativo aumentou a degradação do óleo motor para até 96% em 27 dias de incubação em água do mar em relação ao controle e apresentou capacidade de dispersão de óleo motor (superior a 80%). Assim, o biossurfactante apresenta potencial na remediação de ambientes marinhos contaminados com petroderivados.

Palavras-chave: *Bacillus*. Biossurfactante. Biodegradação. Óleo motor. Água do mar.

ABSTRACT

Oil spills represent a permanent danger to global development. Methods of cleaning and remediation are critical to avoid intoxication and death of organisms after disasters with hydrocarbons. The biosurfactants are amphipathic and reduce surface and interfacial tensions to improve a mixture of two immiscible phases. These compounds are less toxic, more biodegradable and stable under adverse environmental conditions compared to chemical surfactants. In this sense, the objective of this work was to isolate a biosurfactant-producing bacterium and characterize it for application in the biography of marine environments. Biosurfactant-producing bacteria were isolated from seawater samples and identified as belonging to the genus *Bacillus*. The bacteria were cultivated with different carbon (glucose, soybean oil and waste frying soybean oil) and nitrogen (ammonium chloride, sodium nitrate, urea and peptone) sources. The isolate *Bacillus* sp. presented the most promising results for biosurfactant production, being cultivated in mineral medium supplemented with 2% frying oil and 0.12% peptone. After the evaluation of the agitation and the culture time, the conditions were selected: 250 rpm and 48 hours. Under these conditions, the surface tension was reduced to 27 mN/m, the interfacial to 6 mN/m and the biosurfactant yield was 3.5 g/L. Scale-up production was performed in bioreactors, having as results: surface tensions of 28.7, 27.5 and 32 mN/m and yields of 4.3, 4.6 and 4.1 g/L for bioreactors of 1.2; 3 and 50-L, respectively. The biosurfactant was characterized as an anionic lipopeptide with CMC of 500 mg/L. The surfactant increased the degradation of the motor oil to up to 96% in 27 days of incubation in sea water in relation to the control and showed a dispersion capacity of motor oil (above 80%). Thus, the biosurfactant presents potential in the remediation of marine environments contaminated with petroderivatives.

Key words: *Bacillus*. Biosurfactant. Biodegradation. Motor oil. Sea water.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Monômero do surfactante **27**
- Figura 2:** Surfactantes tendem a se associar em interfaces ou em micelas. (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica atacada a cadeia de hidrocarboneto; (b) camada micelar; (c) micela circular; e (d) representação de uma vesícula **27**
- Figura 3:** Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC). **28**
- Figura 4:** Estrutura química da surfactina **33**
- Figura 5:** Halos indicando a produção de biosurfactante. Micro-organismos isolados B1(A), B2(B), B3(C) e B4(D). **54**
- Figura 6:** Gel representativo do produto de amplificação da PCR de aproximadamente 1500 pares de bases da região codificadora do rRNA 16s (isolado B1) . (A) Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Coluna 1- Controle positivo. Coluna 2- produto de amplificação da PCR (B1). Coluna 3- Controle negativo **56**
- Figura 7:** Perfil de crescimento, pH, tensão superficial e concentração de biosurfactante de *Bacillus* sp. cultivada em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h **63**
- Figura 8:** Tensão superficial x concentração de biosurfactante isolado produzido por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h **71**
- Figura 9:** Componentes do biosurfactante detectados utilizando cromatografia em camada delgada. As amostras foram adicionadas em volumes de 20 µL em placas TLC e desenvolvidas com sistema de solvente hexano:acetona (7:3, v/v). A placa de TLC foi pulverizada com anisaldeído, seguido por aquecimento a 110°C durante 1 min **73**
- Figura 10:** Cromatografia gasosa para separação da molécula do biosurfactante produzido por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h **73**

Figura 11: Espectro do ^{13}C NMR (CD_3OD , 300 MHz) do biossurfactante isolado de *Bacillus* sp. em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona. **74**

Figura 12: Espectro do ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) do biossurfactante isolado de *Bacillus* sp. em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona. **75**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Principais classes de biossurfactantes e seus respectivos micro-organismos produtores. 31
- Tabela 2:** Efeito da fonte de carbono na redução da tensão superficial com biossurfactantes produzidos por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão) 58
- Tabela 3:** Efeito da fonte de carbono na produção de biossurfactantes (mg/L) por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão) 58
- Tabela 4:** Efeito da fonte de nitrogênio na redução da tensão superficial (mN/m) com biossurfactantes produzidos por isolados por *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão) 59
- Tabela 5:** Efeito da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante (mg/L) produzidos por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão) 59
- Tabela 6:** Efeito da agitação e tempo de cultivo na redução da tensão superficial (mN/m) por biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral contendo 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona (dados expressos como média \pm desvio padrão) 61
- Tabela 7:** Efeito da agitação e tempo de cultivo na produção de biossurfactante (mg/L) produzido por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral contendo 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona (dados expressos como média \pm desvio padrão) 62
- Tabela 8:** Tensão superficial e produção de biossurfactante por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h sobre agitação de 250 rpm em frascos e biorreatores (dados expressos como média \pm desvio padrão) 66
- Tabela 9:** Influência das concentrações de salina (NaCl), pH, temperatura e tempo de aquecimento a 90 °C na redução da tensão superficial e atividade emulsificante no líquido metabólico livre de células contendo biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de

fritura e 0,12% de peptona por 48h (dados expressos como média \pm desvio padrão) 67

Tabela 10: Capacidade de dispersar óleo motor pelo biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h (dados expressos como média \pm desvio padrão) 76

Tabela 11: Percentuais de biodegradação de óleo motor conduzidos em água do mar com e sem biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 27 dias (dados expressos como média \pm desvio padrão) 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	
NA	Ágar nutriente
AS	Ágar Sangue
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Carbono
CMC	Concentração micelar crítica
CN	Caldo nutriente
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade ótica
EOR	<i>Enhanced oil recovery</i>
EUA	Estados Unidos da America
Jul.	Julho
L	Litros
MEOR	<i>Microbial oil recovery enhancement</i>
mN/m	Milinewtons por metro
N	Nitrogênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
p.	Página
PAH	Poli-hidrocarbonetos aromáticos
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POP	Poluição orgânica de persistência
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TERMOPE	Termelétrida de Pernambuco
TPH	Hidrocarbonetos totais de petróleo
UFC	Unidade Formadora de Colôniaa
U.S.	United States
v.	Volume
Vvm	Ventilação volumétrica máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR DERRAMES DE PETRÓLEO.....	23
2.2	CONSEQUÊNCIAS DAS CONTAMINAÇÕES POR PETRÓLEO E DERIVADOS	24
2.3	REMEDIAÇÃO DE CONTAMINAÇÕES AMBIENTAIS.....	25
2.4	SURFACTANTES	26
2.5	BIOSURFACTANTES	28
2.6	MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES.....	30
2.6.1	Biosurfactantes produzidos por bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	32
2.7	FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	33
2.8	MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES.....	34
2.9	APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE BIOSURFACTANTES NA ÁREA AMBIENTAL.....	35
2.9.1	Recuperação de petróleo	35
2.9.2	Biorremediação	37
2.9.3	Remoção de compostos orgânicos	38
2.9.4	Remoção de metais pesados.....	40
2.10	PERSPECTIVAS INDUSTRIAIS.....	42
3	MATERIAS E MÉTODOS	45
3.1	MICRO-ORGANISMOS	45
3.2	SCREENING DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE	45
3.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE	45
3.4	PREPARAÇÃO DO INÓCULO	47
3.5	MEIOS E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO.....	47

3.6 INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	47
3.7 ESTUDOS DE <i>SCALE UP</i> DE PRODUÇÃO	48
3.8 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	48
3.9 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	48
3.10 TENSÃO SUPERFICIAL E INTERFACIAL E DETERMINAÇÃO DA CMC ..	49
3.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE.....	49
3.13 ISOLAMENTO DO BIOSSURFACTANTE	50
3.14 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	50
3.15 DETERMINAÇÃO DO CARÁTER IÔNICO DO BIOSSURFACTANTE.....	50
3.16 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ¹ H E ¹³ C.....	51
3.17 CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)	51
3.18 TESTE DE DISPERSÃO DE ÓLEO.....	51
3.18 BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DO MOTOR	52
3.20 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 MICRO-ORGANISMOS.....	54
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	55
4.3 EFEITOS DE FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	56
4.4 EFEITOS DE FONTES DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	59
4.5 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	61
4.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES 62	
4.7. ESTUDOS <i>SCALE UP</i> DE PRODUÇÃO	65
4.8 INFLUÊNCIA DA ESTABILIDADE NA TENSÃO SUPERFICIAL E NA ATIVIDADE DE EMULSIFICANTE.....	66
4.9 AS TENSÕES SUPERFICIAL E INTERFACIAL E A CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) DO BIOSSURFACTANTE	69
4.10 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	72

4.11	DISPERSÃO DE ÓLEO DO MOTOR	76
4.12.	BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DE MOTOR	76
5	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Derramamentos de petróleo representam um perigo permanente para o desenvolvimento do mundo. Com aproximadamente 8500 km de litoral, o risco de acidentes no Brasil é enorme e o fato de que grande parte da produção brasileira de petróleo vir da exploração oceânica torna o litoral ainda mais vulnerável aos acidentes (MIRANDA et al., 2016).

Pequenos vazamentos do transporte marítimo representam 98% da perda total de petróleo e derivados. As perdas acidentais representam os 2% restantes e correspondem à liberação de aproximadamente 400 mil toneladas de petróleo para o ambiente por ano. Esses grandes vazamentos atraem mais atenção. O primeiro caso conhecido ocorreu em 1967 e envolveu o naufrágio do *Torrey Canyon*, a partir do qual 123 mil toneladas de petróleo bruto vazaram para o oceano próximo a Inglaterra e França. Um total de 260 mil toneladas de petróleo vazaram do *Castillo de Belver* próximo à África do Sul em 1983 e 40 mil toneladas de petróleo vazaram do *Exxon Valdez* no Alasca em 1989 (CETESB, 2005). Mais recentemente, o vazamento de petróleo da plataforma *Deepwater Horizon* despejou aproximadamente 780 milhões de litros de petróleo no Golfo do México, alguns dos quais foram encontrados a 790 km do local do acidente 16 meses depois (TANSEL, 2014).

Devido à crescente produção de petróleo em diferentes países, especialmente o Brasil, que se tornou o líder mundial na exploração de petróleo em águas profundas, são necessárias medidas preventivas para possíveis derrames de petróleo, pois tais eventos causam sérios danos ao meio ambiente, à biota e aos seres humanos. Assim, existe uma necessidade urgente de desenvolver estudos e novas tecnologias para o tratamento de locais contaminados. Neste contexto, a biotecnologia pode desempenhar um papel fundamental (ALMEIDA et al., 2016).

Métodos de limpeza e remediação são fundamentais para evitar a intoxicação e a morte de um grande número de organismos vivos. Tais procedimentos também são importantes do ponto de vista social, econômico e ambiental. Se um ambiente afetado por um derramamento de óleo permanece degradado por um longo período de tempo devido à falha em adotar métodos

adequados para a remoção de hidrocarbonetos do solo e da água, ele poderia perder funções em termos de equilíbrio ecossistêmico, bem como o desenvolvimento das atividades sociais e econômicas.

Os critérios para selecionar o método de limpeza mais eficiente variam de derramamento para derramamento e dependem do tipo e quantidade de óleo derramado, bem como das condições climáticas e ambiente circundante (SCHRAMM, 2000). Para a remoção completa, os derramamentos de óleo requerem mais do que métodos físico-químicos sozinhos (PRINCE et al., 2003). A biorremediação é uma alternativa atrativa e ambientalmente amigável (RAHMAN et al., 2002). De fato, estudos relataram o uso bem-sucedido da biorremediação em casos de derrames de petróleo (ATLAS, 1995; MEARNS, 1997; RADWAN et al., 2005; GREENWOOD et al., 2009). Contudo, os hidrocarbonetos de petróleo são em grande parte insolúveis em água e a sua biodisponibilidade é limitada. Assim, os tensoativos são utilizados para melhorar a mobilidade do óleo e melhorar o processo de biodegradação (LAHA et al., 1995).

Surfactantes naturais, conhecidos como biossurfactantes microbianos, afetam interfaces em soluções aquosas e hidrocarbonadas (BORDOLOI; KONWAR, 2009). O aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos e a emulsificação de misturas de hidrocarbonetos e água (BANAT, 1995) melhoram a capacidade das bactérias degradadoras de óleo de usarem hidrocarbonetos (RON; ROSENBERG, 2002; BAO et al., 2012). Os biossurfactantes são anfipáticos e reduzem as tensões superficiais e interfaciais para melhorar a mistura de duas fases imiscíveis. Esses compostos naturais têm menos toxicidade, mais biodegradabilidade, melhor espuma e maior estabilidade sob condições ambientais adversas em comparação com surfactantes químicos, o que torna essas biomoléculas promissoras alternativas comerciais (BANAT et al., 2010).

O gênero *Bacillus* tem sido investigado com relação à produção industrial de biossurfactantes. *B. licheniformis* e *B. subtilis* produzem metabolitos ativos superficiais. *B. subtilis* produz um biossurfactante que reduz a tensão superficial e a tensão interfacial de misturas de água e água/n-hexadecano de 72 a 27 mN/m e 43 a 1 mN/m, respectivamente (NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Os biossurfactantes representam atualmente 10% da produção mundial de biotensioativos (cerca de 10 milhões de toneladas por ano) e são aplicados ao petróleo, aos alimentos (produção de emulsificantes alimentares), aos farmacêuticos (formulação de cremes, medicamentos e agentes antimicrobianos) e agrícola (produção de fertilizantes), bem como engenharia civil (tratamento de resíduos e esgoto) e outras indústrias (SANTOS et al., 2016).

A produção bem sucedida de biossurfactantes à escala industrial requer o aumento de cepas bacterianas, processos de aumento de escala mais baratos e a otimização das condições de cultura e dos componentes do meio utilizando métodos estatísticos, juntamente com a utilização de matérias-primas baratas, que correspondem a 10 a 30% do custo de produção global (NITSCHKE; PASTORE, 2004; JOSHI et al., 2008a,b; DEEPIKA et al. 2017). Milhões de toneladas de resíduos são jogados fora cada ano em todo o mundo. O tratamento e a remoção desses resíduos representam custos elevados para diferentes indústrias (MARCHANT; BANAT, 2012a). Assim, o desperdício industrial tem estimulado o interesse dos pesquisadores como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Os óleos vegetais, óleos vegetais de fritura (subproduto de processos de fritura), resíduo de destilarias de petróleo, subprodutos da indústria de laticínios (soro de leite), melão de cana-de-açúcar e glicerina têm sido citados na literatura (SANTOS et al., 2016).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi isolar e selecionar bactérias produtoras de biossurfactante da água do mar de uma região contaminada com hidrocarbonetos. Definiu-se as melhores condições de cultivo, caracterizou-se e determinaram-se as propriedades da biomolécula, avaliou-se a produção em maior escala e investigou-se a dispersão e degradação de petroderivados em água do mar com o auxílio do biossurfactante.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir um biossurfactante com potencial de aplicação na remediação de derivados de petróleo em água do mar.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar e realizar um *screening* bactérias da água do mar com capacidade de crescimento em óleos e produtoras de biossurfactante.
- Identificar as melhores bactérias produtoras de biossurfactantes.
- Avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, estabelecer o melhor meio de produção e a melhor cepa produtora do biossurfactante entre as bactérias identificadas.
- Avaliar a influência do tempo de cultivo e da agitação na produção do biossurfactante pela bactéria selecionada.
- Produzir o biossurfactante em escala piloto industrial.
- Determinar a tensão superficial e interfacial, a concentração micelar crítica, a carga iônica, a capacidade de emulsificação de hidrocarbonetos e óleos vegetais e a capacidade dispersante em água do mar do biossurfactante.
- Isolar o biossurfactante e determinar o rendimento de produção.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante, em relação à tensão superficial e ao poder de emulsificação, frente a condições específicas de temperatura, pH, tempo de aquecimento e na presença de sal.
- Elucidar a estrutura molecular do biossurfactante.

- Simular experimentos de remediação de derivado de petróleo em água do mar com o biossurfactante e a sua espécie produtora.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR DERRAMES DE PETRÓLEO

A liberação de contaminantes, tais como petróleo e produtos petrolíferos derivados, para o meio ambiente é uma das principais causas da poluição global e tornou-se um foco de grande preocupação, tanto em países industrializados como em desenvolvimento, uma vez que esses hidrocarbonetos e derivados estão presentes em diversos setores que utilizam e/ou poluem o ambiente, causando danos em solos, águas subterrâneas, e ar (SILVA et al., 2014b, LEBRERO et al., 2012). As fontes de contaminação são diversas: acidentes durante o transporte de combustível por navios e caminhões; vazamento de tanques de armazenamento subterrâneo que estão sujeitos à corrosão, como postos de gasolina; operações de extração de petróleo e de transformação e lançamento inadequado de resíduos gerados pelas indústrias que utilizam derivados de petróleo na produção de plásticos, solventes, produtos farmacêuticos e cosméticos (LAWNICZAK et al., 2013, LIN et al., 2010). Metade da produção de petróleo do mundo (cerca de três bilhões de toneladas / ano) é transportado por navios e os níveis de contaminação por hidrocarbonetos em diferentes ecossistemas marinhos têm aumentado devido a acidentes. A principal fonte de hidrocarbonetos nos oceanos vem de operações de rotina como a lavagem do navio, o vazamento de óleo natural no fundo do mar e os acidentes durante a exploração e o transporte de petróleo (SOUZA et al., 2014).

A mídia tem, constantemente, relatado o vazamento de milhares de toneladas de petróleo que contaminam a água do mar (PAMPLONA, 2016). Um dos derramamentos de maior impacto ocorreu em Novembro de 2011, sobre a plataforma de petróleo Sedco 706, operada pela Chevron Brasil na Baía de Campos (Rio de Janeiro, Brasil). Um total de 5.943 litros vazam, que abrangendo uma área de 163 km² (SOUZA et al., 2014). Outro dos maiores derrames de petróleo no mundo ocorreu no Golfo do México, em 2010, em consequência da explosão de uma plataforma petrolífera próxima da costa dos estados de Louisiana e Mississippi (EUA). Após o naufrágio da plataforma, os dutos abertos na área de perfuração (profundidade de 1,5 kms) continuaram despejando

petróleo no mar por um período de três meses antes de finalmente ser tampado. Relatórios oficiais indicam a libertação de mil barris de petróleo por dia, com um total estimado de quatro a cinco milhões de barris de óleo derramado, tornando este o maior desastre ambiental da história dos Estados Unidos (PEZESHKI; DELAUNE, 2015). Em janeiro de 2000, mais de 1,3 milhões de litros de petróleo pesado vazaram de um oleoduto da refinaria na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro, Brasil, causando grandes danos a áreas de mangue preservado (MACIEL-SOUZA et al., 2006).

2.2 CONSEQUÊNCIAS DAS CONTAMINAÇÕES POR PETRÓLEO E DERIVADOS

A introdução de grandes quantidades de petróleo bruto no ambiente marinho, nas águas subterrâneas e no solo pode causar danos significativos para os organismos autóctones (LIN et al., 2014). O petróleo é um hidrocarboneto hidrófobo com efeitos negativos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares em organismos vivos, oferecendo considerável risco de contaminação em ambos os ecossistemas, marinhos e terrestres (SOBRINHO et al., 2013a).

Nas últimas décadas, segundo Tehrani et al. (2016), o aumento do nível de contaminação de traça poluição orgânica de persistência (POP) em meio aquático causa preocupação ambiental devido ao seu amplo uso e toxicidade. Os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH's) e os poli-hidrocarbonetos aromáticos (PAH's) em águas marinhas e costeiras foram classificados como grupos POP pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) (TAVAKOLY SANY et al., 2014, TEHRANI et al., 2016). A maioria destes produtos químicos tóxicos foram proibidos devido ao seu potencial de toxicidade para os seres humanos, meia-vida longa, ampla distribuição e elevada bioacumulação na cadeia alimentar (devido ao carácter lipofílico) (HAFFNER; SCHECTER, 2014)

Quando em contato com a água, o petróleo se espalha formando uma fina camada sobre a superfície. Alterando assim, a troca de gases entre o ar e a água, a passagem de luz solar, impedindo assim o processo de respiração e

fotossíntese. Assim, os resíduos de hidrocarbonetos impactam as comunidades de fitoplâncton, causando um colapso na cadeia alimentar (YEUNG et al., 2011, ASIMIEA; SAM-WOBO, 2011).

A ameaça potencial para a saúde humana, no contato com esses hidrocarbonetos, está ligada às propriedades físicas e químicas destes compostos, que são absorvidos pela pele e rapidamente se espalham pelo organismo (COSTA et al., 2012, BACHMANN et al., 2014).

2.3 REMEDIAÇÃO DE CONTAMINAÇÕES AMBIENTAIS

Os derramamentos de hidrocarbonetos ocorrem durante o transporte da carga ou na forma de derrames e descartes inadequados de petróleo e/ou seus derivados industriais.

Segundo Ivihina et al. (2015), atualmente existem quatro categorias principais de tecnologias de limpeza disponíveis para a remediação de derramamentos de petróleo em ambiente marinho: tratamento químico (dispersantes, disjuntores de emulsão); queima *in situ*; recuperação mecânica (barreiras de contenção “booms”, escumadeiras, separadores de óleo e água, adsorventes; e biorremediação. Entre estas categorias aquela que oferece melhor retorno para o ambiente é a biorremediação, com destaque para os biossurfactantes, este melhora a dispersão dos contaminantes na fase aquosa e aumentar a biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para micro-organismos, com a remoção subsequente de tais poluentes por biodegradação, com a vantagem de ter baixa toxicidade e ser biocompatível.

Para além dos derramamentos em ambiente marinho, a biorremediação é uma das tecnologias indicadas, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, além disso, entre as diferentes tecnologias propostas (físicas, químicas e biológicas) para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, a via biológica é a mais estudada (SANTOS et al., 2016). Este processo, em solo, envolve a capacidade de degradação natural de plantas e micro-organismos, quer para a conversão parcial de contaminantes em compostos menos tóxicos ou a conversão completa de tais substâncias em dióxido de carbono e água. Para auxiliar nesse processo, os biossurfactantes, mais uma vez, se mostram úteis

uma vez que podem possibilitar o aumento da disponibilidade do substrato hidrofóbico, sendo alternativa a processos químicos e mecânicos utilizados na recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos: incineração, dessorção térmica, a solidificação/estabilização e extração de vapores do solo (IVIHINA et al., 2015).

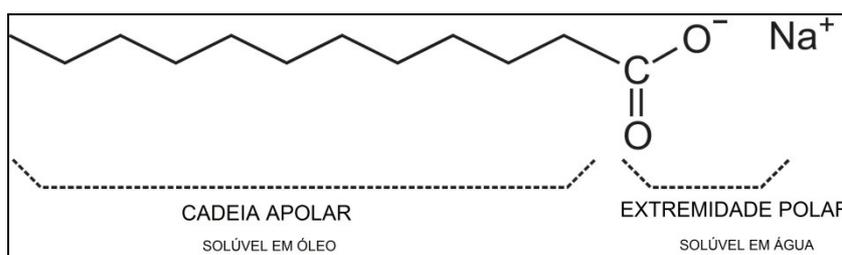
Outro tipo de contaminação muito prejudicial ao meio ambiente e a saúde pública, motivo de preocupação para a sociedade contemporânea, é a por metais pesados. A contaminação do solo por metais pesados é resultante de diferentes atividades industriais, como a mineração, a produção de baterias para veículos, resíduos industriais e a dispersão de lavagem de processos de incineração. Sarubbo et al. (2015) destaca os biotensoativos como alternativa às técnicas tradicionais (imobilização em matriz sólida, migração para fase líquida por dessorção e a solubilização e limpeza com ácidos e agentes quelantes), devido à natureza iônica dessas biomoléculas, bem como a sua biodegradabilidade, baixo grau de toxicidade e as propriedades superficiais excepcionais, tornam os biossurfactantes potenciais candidatos para a remoção de metais pesados de solos e sedimentos.

2.4 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos anfipáticos contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água, características que os fazem com que eles sejam normalmente usados para separar os materiais oleosos de um determinado meio, fazendo dessa molécula componente essencial de sabões e detergentes (RUFINO et al., 2011). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (SINGH et al., 2007), como ilustrado na Figura 1. Essas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial nas interfaces entre sólidos, líquidos e gases, permitindo desse modo misturar ou dispersar prontamente como emulsões em água ou em outros líquidos, sendo possível que hidrocarbonetos solubilizem em água ou a água solubilize em

hidrocarbonetos, através de microemulsões (LUNA et al., 2009, RAUTELA; CAMEOTRA, 2014). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade “molhante”, solubilização e dispersão de fases (AL-ARAJI et al., 2007).

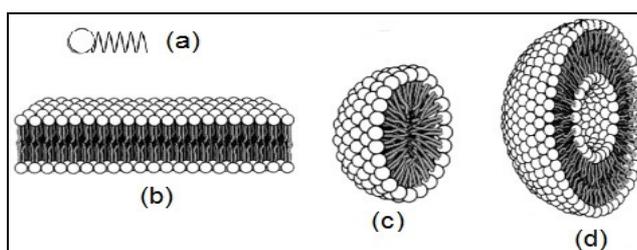
Figura 1: Monômero do surfactante



Fonte: Autor

A propriedade de maior importância para os agentes tensoativos é a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (Figura 2). A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 3). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (RUFINO et al., 2008).

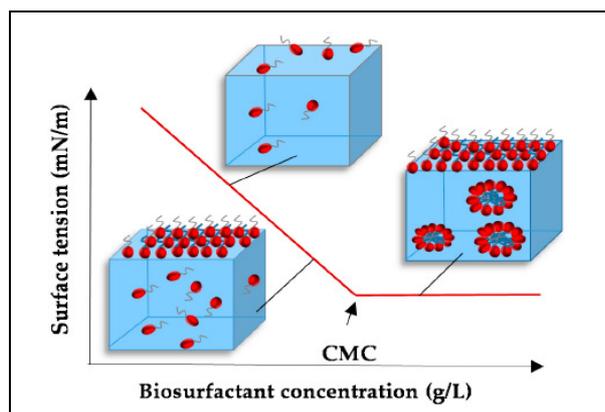
Figura 2: Surfactantes tendem a se associar em interfaces ou em micelas. (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica atacada a cadeia de hidrocarboneto; (b) camada micelar; (c) micela circular; e (d) representação de uma vesícula



Fonte: Autor

A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007).

Figura 3: Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC).



Fonte: SANTOS et al., 2016

2.5 BIOSSURFACTANTES

O avanço das tecnologias sustentáveis tem impulsionado a busca de compostos biodegradáveis, naturais para remediar locais contaminados por hidrocarbonetos. Isto levou à descoberta de agentes surfactantes de uma origem natural. A maior parte destes surfactantes é sintetizada por organismos vivos, tais como, saponinas produzidas por plantas, glicolípídeos produzidos por micro-organismos, e sais biliares produzidos pelos animais. Os compostos com propriedades surfactantes produzidos por microrganismos são denominados biossurfactantes (SOUZA et al., 2014).

Biossurfactantes são principalmente produzidos por micro-organismos aeróbicos em meio aquoso com disponibilidade de fonte de carbono, tais como carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras e óleos. Acredita-se que biossurfactantes são secretados para o meio de cultura para auxiliar no crescimento do micro-organismo através da facilitação da translocação de substratos insolúveis através das membranas celulares (CAMPOS et al., 2013). Estes compostos possuem

moléculas anfipáticas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que atuam entre os fluidos de diferentes polaridades (óleo / água e água / óleo), permitindo o acesso aos substratos hidrofóbicos e causando uma redução da tensão superficial, um aumento na área de contato de compostos insolúveis (tais como hidrocarbonetos) e o aumento da mobilidade, biodisponibilidade, e de biodegradação. A porção lipofílica pode ser uma proteína ou peptídeo com uma porcentagem elevada de cadeias laterais hidrofóbicas ou uma cadeia de hidrocarboneto de um ácido graxo com 10 a 18 átomos de carbono, embora que haja relatos de uso de ácidos graxos com um peso molecular mais elevado. A porção hidrofílica pode ser um éster, hidróxido, fosfato, grupo carboxila, ou açúcar (CAMPOS et al., 2013). Biossurfactantes são geralmente classificados em moléculas de baixo peso molecular, que eficientemente diminui a tensão superficial e interfacial, e polímeros de alto peso molecular, que são mais eficazes como agentes de estabilização da emulsão. As principais classes de surfactantes de baixo peso são glicolipídios, lipopeptídios, e fosfolipídios, enquanto que os surfactantes de elevado peso incluem poliméricos e surfactantes particulados (KAPADIA; YAGNIK, 2013).

Biossurfactantes oferecem vantagens sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, devido à sua estrutura química simples, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, o que permite utilizar na indústria da cosmética, farmacêutica e de alimentos, elevada seletividade devido à presença de grupos funcionais específicos, permitindo especificidade na desintoxicação de poluentes específicos e atividade em condições de temperaturas extremas, pH e salinidade (VECINO et al., 2015, SANTOS et al., 2013). Essas características contribuem para a aplicabilidade de biossurfactantes em diferentes indústrias (LAWNICZAK et al., 2013, BANAT et al., 2010). O fato de biossurfactantes serem caracterizados por uma grande diversidade estrutural e apresentar uma ampla gama de propriedades pode explicar porque este grupo de moléculas continua a despertar interesse científico (SARUBBO et al., 2015).

Inúmeros exemplos demonstram o potencial de aplicação de biossurfactantes em descontaminação ambiental, como foi estudado por Sobrinho et al. (2013b) que testou um biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* para a remoção de óleo de motor em testes realizados com água do mar, e este

biossurfactante exibiu uma eficiência na dispersão do óleo de 75%, demonstrando o seu potencial para aplicação como coadjuvante em processos biotecnológicos de descontaminação ambiental. Já Mouafi et al. (2016) observaram resultados satisfatórios de dispersão e emulsificação de óleo motor em água, utilizando o biotensoativo produzido por *Bacillus brevis*. O potencial de aplicação para contaminação de óleo em solo foi testado por Liu et al. (2015), que observaram o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* BS-37, este apresentou uma taxa de remoção de 96% de óleo motor adsorvido em areia, o que demonstra um considerável potencial para uso em processos de biorremediação. Youssef et al. (2013) testaram a eficiência do biossurfactante de diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, para variadas misturas de hidrocarbonetos em colunas com areia, e observaram que houve aumento na recuperação de óleo em todos os casos, destacando 6-25% de aumento da recuperação para o óleo de aquecimento, 16-24% para parafina viscosa, 13-18% para o óleo *Arabian Light* e 15-17% para o petróleo bruto pesado.

2.6 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Keskin et al. (2015) afirma que um grande número de micro-organismos, tais como fungos, leveduras e bactérias, são capazes de produzir e secretar vários tipos de biossurfactantes, como visto na Tabela 1.

Esses micro-organismos atuam melhorando o metabolismo de substâncias imiscíveis em água pelos micro-organismos (SOBRINHO et al., 2013a, BANAT et al., 2010). Existem vários métodos rápidos para determinação da produção de biossurfactantes pelos micro-organismos; entre eles, o teste da atividade hemolítica, que de acordo com Carrillo et al. (1996) a hemólise das hemácias tem relação com as propriedades anfipáticas dos biossurfactantes, sendo um fator preditivo para detecção primária da produção dessas biomoléculas, principalmente as que são produzidas por bactérias.

A literatura descreve, entre as bactérias, as dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* como grandes produtoras de biossurfactantes (SANTOS et al., 2016). O gênero *Pseudomonas* é conhecido por sua capacidade de produzir extensas quantidades de glicolipídeos, que são classificados como rhamnolipídeos

enquanto que as bactérias do gênero *Bacillus* são grandes produtoras de lipopetídeos.

Muitas espécies de leveduras do gênero *Candida* também tem se destacado em estudos para produção de biossurfactante de acordo com Campos et al. (2013) e Santos et al. (2016).

Tabela 1: Principais classes de biossurfactantes e seus respectivos micro-organismos produtores.

Classes/Tipos de Biossurfactantes	Micro-organismos
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Lipopeptídeos	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcenscens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos netros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manose-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactante particulado	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Fonte: Silva et al., 2014

2.6.1 Biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*

As espécies do gênero *Bacillus* são cosmopolitas e morfologicamente diversificadas. Algumas delas podem produzir diversos lipopeptídeos, sendo consideradas as maiores produtoras desta biomolécula, demonstrando o grande potencial tensoativo dessas bactérias (LIU et al., 2010). Biossurfactantes lipopeptídicos apresentam propriedades antimicrobianas, pois interagem de forma ampla com as membranas celulares, e além dessa importante propriedade, também podem atuar na remoção de compostos hidrofóbicos do meio ambiente (MARCHANT et al., 2014).

Cepas de *Bacillus subtilis* são conhecidas por sua eficiência na produção de um lipopeptídeo cíclico com atividade de superfície, denominado surfactina ou subtilisina (SOUZA et al., 2014; AL-BAHRY et al., 2013), além de lichenicina, iturina e fengicina (LIU et al., 2010)

A capacidade de síntese surfactina é amplamente distribuída não só entre *B. subtilis*, mas também entre *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*. A produção da biomolécula, por esses micro-organismos, ocorre durante a fase estacionária, quando os nutrientes no meio de cultura são limitados (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

A surfactina tem sido demonstrada como um dos biossurfactantes mais eficazes, com maior eficiência em biorremediação e no melhoramento de recuperação microbiana de óleo “*in situ*”, apresentando resultados mais promissores do que os raminolipídeos e, portanto, pode ter potencial para o desenvolvimento bioindustrial em grande escala (MARCHANT et al., 2014). Em termos estruturais, a surfactina (FIGURA 4) consiste em um heptapeptídeo ligado a um ácido graxo β -hidróxi, que contenha um número de 13 a 15 carbonos, características observadas por Faria et al. (2011) na biomolécula produzida por *B. subtilis* LSFM-05 e numa surfactina comercial.

Figura 4: Estrutura química da surfactina



Fonte: Autor

A surfactina foi descrita por como um Arima et al. (1968) lipopeptídeo aniônico de massa molecular igual a 1050 ± 100 Da. Apresentando-se na forma de cristais em agulha de coloração branca, com ponto de fusão entre $137-140^\circ\text{C}$. Com solubilidade em água alcalinizada, acetona, metanol, etanol, benzeno, clorofórmio e ácido acético glacial; insolúvel em água e ácidos minerais; e fracamente solúvel em tetracloreto de carbono, éter de petróleo, hexano e ciclohexano. Estável em pH de 7-9 a 120°C por 30 minutos, apresenta reação positiva para biureto e negativa para ninhidrina, sendo precipitada em soluções alcalinas com 50% de saturação com sulfato de amônio ou metais divalentes.

2.7 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A produção de biosurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipófilos, as variações no pH, temperatura, arejamento e velocidade de agitação ou quando o crescimento celular é mantida sob condições de stress, tal como uma baixa concentração de nitrogênio (SANTOS et al., 2016). Bhardwaj et al. (2013) também citam fatores físico-químicos (pH, temperatura e tempo de incubação) e as fontes de carbono e de nitrogênio como importantes influenciadores para a produção de biosurfactante.

A fonte de carbono desempenha um papel importante no crescimento e produção de biosurfactantes por micro-organismos e varia de espécie para espécie. O nitrogênio é o segundo suplemento mais importante para a produção de biosurfactantes pelos micro-organismos. Em processos fermentativos, a relação Carbono/Nitrogênio afeta a acumulação de metabolitos. Valores elevados

nas razões de C/N (isto é, níveis baixos de azoto) limitam o crescimento de bactérias, favorecendo o metabolismo das células para a produção de metabolitos. Em contraste, o nitrogênio em quantidade excessiva leva à síntese de material celular e limita a acumulação de produtos (SANTOS et al., 2016).

Diferentes fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas têm sido utilizadas na produção de biossurfactantes. Mulligan e Gibbs (1989) relataram que *P. aeruginosa* usa nitratos, amônia e aminoácidos como fontes de nitrogênio. Os nitratos são em primeiro lugar reduzido a nitrito e em seguida, de amônio. O amônio é assimilado e levado por vias metabólicas até formar aminoácidos, por exemplo. Em comparação com o amônio, a assimilação de nitrato é mais lenta e simula limitação de nitrogênio, o que é favorável para a produção de raminolípídeos, pois a formação de lipídeos, em vez de açúcar é o fator determinante na velocidade da biossíntese de raminolípídeos e a limitação de nitrogênio pode levar à acumulação de lipídeos. Santa Anna et al. (2002) descreve a importância do nitrogênio, para a produção de um biotensioativo por *P. aeruginosa* cultivadas em meio mineral contendo 3% de glicerol. Como NaNO_3 provou ser mais eficaz do que a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, limitações nutricionais guiam claramente o metabolismo da célula para a formação do produto. Outros estudos apresentaram altos rendimentos de manosileritritol lipídeo, produzidos por *C. lipolytica* e *C. glabrata*, alcançados com nitrato de amônio e extrato de levedura (RUFINO et al., 2008, SARUBBO et al., 2006)

2.8 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A necessidade de preservação do meio ambiente levou à reutilização de diferentes tipos de resíduos industriais, com destaque para a indústria de produção de alimentos, com resíduos de produtos, efluentes e subprodutos que podem ser reutilizados (BANAT et al., 2014).

Por serem de baixo custo, os resíduos industriais tem despertado o interesse de pesquisadores como um substrato para produção de biossurfactante. Os produtos residuais selecionados devem possuir o equilíbrio adequado de nutrientes para permitir o crescimento microbiano e conseqüente produção de

biossurfactante, destacando aqueles resíduos industriais com um elevado teor de hidrocarbonetos ou lipídeos, como os ideais para uso como substrato (SANTOS et. al, 2016).

Santos et al. (2016) destaca uma série de resíduos de produtos observados na literatura e utilizados na produção de biossurfactante, tais como óleos vegetais, efluentes oleosos, efluentes ricos em amido, gordura animal, gordura vegetal, óleo vegetal de cozinha residual, borra, melaço, resíduos da indústria de laticínios (soro), milhocina, águas residuais da produção de farinha de mandioca, resíduos da destilaria de óleos, e glicerol.

Dentre esses resíduos destaca-se o óleo de fritura como grande fonte de carbono para a produção de biossurfactante, resíduo de fácil obtenção e baixo custo. Os óleos vegetais constituem uma fonte de carbono e de lipídeo, estes são formados principalmente por ácidos gordos saturados ou insaturados com cadeias de 16 a 18 átomos de carbono (MAKKAR et al., 2011). Ramírez et al. (2015) utilizou óleo de oliva residual como fonte de carbono para produzir ramniolipídeo e surfactina a partir de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, respectivamente, e verificou o potencial desta fonte para produção de biossurfactantes. Usando óleo de soja como substrato, Li et al. (2016) produziu um biossurfactante lipopeptídico a partir do *Bacillus pseudomycooides* BS6 que proporcionou uma redução de tensão da água para $30,2\text{mNm}^{-1}$ e uma taxa de emulsificação para óleos vegetais e hidrocarbonetos que variou de 62,8 - 94,2%.

2.9 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE BIOSSURFACTANTES NA ÁREA AMBIENTAL

2.9.1. Recuperação de petróleo

Os métodos tradicionais de recuperação de óleo estão inseridos nos processos conhecidos como EOR (*Enhanced oil recovery*), que incluem, por exemplo, o uso de calor, compostos químicos tais como surfactantes, e a injeção de gás miscível. Contudo os custos químicos elevados impediram o uso generalizado de surfactantes para recuperação avançada de petróleo (YOUSSEF et al., 2013).

Pereira et al. (2013), afirma que a substituição de tensoativos sintéticos convencionais por biocompostos parece ser uma abordagem boa e eficiente; no entanto, ainda depende da estratégia adotada, e é nisso que se baseia a recuperação avançada de petróleo por via microbiana (MEOR - *Microbial Oil Recovery Enhancement*). Métodos de MEOR são usados para recuperar o óleo remanescente em reservatórios após os procedimentos de recuperação primária (mecânico) e secundária (físico) (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Silva et al. (2014a) descreve a recuperação avançada de petróleo como um importante processo terciário no qual os micro-organismos ou um dos seus metabólitos, incluindo biossurfactantes, biopolímeros, biomassa, ácidos, solventes, gases e enzimas, também são utilizados para aumentar a recuperação de petróleo a partir de depósitos esgotados. Alvarez et al. (2015), fez simulações de MEOR com biossurfactante produzido por *B. amyloliquefaciens* e obteve recuperação de hidrocarbonetos de petróleo superior a 90%, enquanto que Khondee et al. (2015) obteve 100% de recuperação de óleo, usando a técnica de fracionamento por espuma, usando do biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. GY19.

A aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo é um dos métodos mais promissores para recuperar uma parte substancial do óleo residual, que fica muitas vezes localizado em regiões do reservatório que são de difícil acesso sendo o óleo aprisionado nos poros por pressão capilar, por atuarem na redução da tensão superficial do óleo residual ao diminuir as forças capilares que impedem a circulação desse óleo através dos poros da rocha. Os EUA, por exemplo, produzem 870.000 m³ de petróleo bruto provenientes de 530 mil poços, 35% do que produzem 0,16 m³/dia e 79% produzem <1,59 m³/dia (SUMMERS, 2011). Através de processos de recuperação de petróleo, avalia-se que esses poços de petróleo produzem apenas um terço a metade do petróleo originalmente presentes nos locais. Gudiña et al. (2013) demonstrou a eficiência da recuperação de óleo residual em reservatórios maduros, períodos longos de exploração, e teve resultados que mostram um aumento de recuperação de 6-25% para o óleo de aquecimento, 16-24% de parafina viscosa, 13-18% para o óleo árabe leve e 15-17% para o petróleo bruto pesado.

A atuação dos biossurfactantes na redução da tensão interfacial entre óleo / água e óleo / rochas nos poros das rochas dos reservatórios de petróleo, leva a

uma redução nas forças de capilaridade que impedem o óleo de mover-se através dos poros das rochas. Biossurfactantes também pode formar uma emulsão na interface óleo-água, o que estabiliza o óleo dessorvido em água e permite a remoção de óleo, juntamente com a água de injeção (MAO et al., 2015; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

2.9.2 Biorremediação

A biorremediação envolve a capacidade de degradação natural de plantas e micro-organismos tanto para a conversão parcial de contaminantes em compostos menos tóxicos ou a conversão completa de tais substâncias em dióxido de carbono e água.

A presença de grandes populações de micro-organismos leva a uma mais rápida e mais eficiente processo de biorremediação. Portanto, esta técnica pode ser realizada através de bioestimulação, o qual consiste em estimular o crescimento de micro-organismos presentes no local contaminado. O processo envolve a introdução de receptores de elétrons específicos, de oxigênio e nutrientes para a degradação do contaminante, bem como substâncias para corrigir o pH. Biorremediação também pode ser realizada através de bioaugmentação, no qual os micro-organismos nativos (alóctonos) são adicionados ao ambiente contaminado para acelerar e completar a degradação do poluente (SANTOS et al., 2015)

Biorremediação desempenhou um papel importante na limpeza do derramamento de petróleo 41.000 mil litros causado pelo petroleiro Exxon Valdez no Golfo do Alasca, em 1989, dando origem ao desenvolvimento desta tecnologia e demonstrar que há boas razões para acreditar na eficácia aplicação deste método de tratamento em derrames de petróleo futuras sob as circunstâncias adequadas (MORRIS; LOUGHLIN, 1994). No acidente com o Exxon Valdez, a primeira medida tomada foi a lavagem física com água de alta pressão. Tensoativos químicos foram então aplicadas em áreas poluídas para acelerar o crescimento e atividade dos microrganismos que degradam o petróleo. Duas ou três semanas mais tarde, as regiões tratadas com agentes tensoativos eram significativamente mais limpo do que as áreas de controlo. No entanto, foi difícil

de avaliar os efeitos exatos do tratamento devido à heterogeneidade da contaminação. No entanto, estudos posteriores demonstraram a importância do uso de agentes tensoativos para aumentar a biodegradação de óleo (SATPUTE et al., 2010).

Embora a biorremediação seja um método eficaz, ambientalmente compatível, o tempo e os custos envolvidos tornam esse processo inviável para o tratamento de grandes quantidades de resíduos (SHAVANDI et al., 2011). Assim, a utilização de biossurfactantes neste processo surge como uma alternativa segura para melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos, permitindo a dessorção e solubilização dos hidrocarbonetos e facilitando a assimilação destes compostos por células microbianas (KUYUKINA et al., 2005).

A biodegradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo por biossurfactantes ocorre através de dois mecanismos. O primeiro envolve um aumento na biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para micro-organismos, com a consequente redução da tensão de superfície do meio em torno da bactéria bem como uma redução da tensão interfacial entre a parede da célula e moléculas de hidrocarbonetos. O outro mecanismo envolve a interação entre o biotensoativo e da superfície celular, conduzindo a alterações na membrana, o que facilita a adesão de hidrocarboneto (aumento na hidrofobicidade) e a redução do índice de lipopolissacarídeos da parede celular, sem danificar a membrana. Assim, biossurfactantes bloqueiam a formação de pontes de hidrogênio e permitem interações hidrofóbicas-hidrofílicas, o que causa rearranjos molecular e reduzir a tensão de superfície do líquido ao aumentar a sua área de superfície, bem como a promoção da biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (APARNA et al., 2011; FRANZETTI et al., 2009).

Jadhav et al. (2013) observou que a adição de biossurfactante produzido por *Oceanobacillus* sp. ao meio rico em células bacterianas aumentou a biodegradação de óleo bruto para até 90%, enquanto os teste usando apenas células bacterianas como agentes de degradação obtiveram êxito de até 63% apenas.

2.9.3 Remoção de compostos orgânicos

A aplicação de biossurfactantes para a remoção de contaminantes do solo é menos conhecido do que o aplicativo avançado destes compostos em processos de biorremediação, uma vez que a eficiência de remoção é impulsionada principalmente pelas propriedades físico-químicas da biossurfactante em vez de os efeitos sobre a atividade metabólica ou alterações nas propriedades de superfície da célula. No entanto, os mecanismos que afetam a mobilização e a solubilização de hidrocarbonetos no solo são semelhantes aos envolvidos no aumento de biodisponibilidade para a biorremediação (BAI et al., 1997; FRANZETTI et al., 2009).

Biossurfactantes melhorar a remoção de hidrocarbonetos através da biodegradação, solubilização, mobilização ou emulsificação (PACWA-PLOCINICZAK et., 2011). A capacidade de solubilização depende da habilidade do tensioativo para aumentar a solubilidade dos componentes hidrofóbicos na fase aquosa. Um considerável aumento da capacidade deste ocorre acima da CMC, devido à partição do hidrocarboneto na porção hidrofóbico das micelas. Neste processo, maiores concentrações de surfactantes são normalmente necessários, uma vez que a solubilidade dos componentes de hidrocarbonetos na solução depende inteiramente da concentração do agente tensioativo (PACWA-PLOCINICZAK et., 2011). Mobilização ocorre a concentrações abaixo da CMC e é dividido em deslocação e dispersão. Deslocação consiste na libertação de gotículas de hidrocarbonetos do meio poroso devido à redução na tensão interfacial. Usando uma explicação teórica, a remoção de hidrocarboneto é possível quando a tensão interfacial entre as fases aquosa e de óleo é suficientemente reduzida para vencer as forças de capilaridade que causam a formação de saturação residual. A dispersão é um processo pelo qual um hidrocarboneto é disperso na fase aquosa, como emulsões minúsculas. As emulsões não são geralmente termodinamicamente estáveis, mas podem permanecer estáveis por períodos de tempo significativos, devido a restrições cinéticas. Dispersão está relacionada com a tensão interfacial e concentração de surfactante e difere da deslocação, que está relacionada apenas com a tensão interfacial entre as fases aquosa e hidrofóbicos, sem formação de emulsão (BAI et al., 1997).

A eficácia de um agente tensoativo na remoção de compostos hidrofóbicos também depende do pH e da força iônica da solução, o que pode alterar a disposição das micelas de agregados e de sorção do agente tensoativo para o solo, o que, por sua vez, limita o transporte de o hidrocarboneto pelo surfactante. Diferentes biossurfactantes já foram testados para a remoção dos produtos derivados do petróleo do solo e da água contaminada. Entre os diversos tensoativos utilizados em processos de descontaminação biotecnológicas está a surfactina, com remoções superiores a 85% com a biomoléculas produzidas por *Bacillus licheniformis* (KAVITHA et al., 2014) e 88% por *Bacillus subtilis* (FERNANDES et al., 2016). Outros tensoativos produzidos por espécies de *Pseudomonas* (WINTERBURN et al., 2011; SILVA et al., 2013), *Bacillus* (GUDIÑA et al., 2013; VIJAYAKUMAR et al., 2015), e *Candida* (BHARDWAJ et al., 2013; SOBRINHO et al., 2013b; CHAPRÃO et al., 2015), também têm sido utilizados com sucesso na recuperação de solos.

2.9.4 Remoção de metais pesados

Metais pesados e radionuclídeos são contaminantes persistentes solo. O aumento dos níveis de metais pesados no solo tem sido relatado em muitos países industrializados. Metais e metalóides tais como cromo, cádmio, mercúrio e chumbo, podem ameaçar os ecossistemas e a saúde humana, quer através da cadeia alimentar ou a exposição direta ao solo e a água contaminada (MAO et al., 2015; CHAKRABORTY; DAS, 2014). Uma vez que diferentes tecnologias podem ser utilizadas em combinação para o tratamento de poluentes orgânicos e metais pesados, biossurfactantes pode ser usada na remoção de compostos orgânicos hidrofóbicos e metais pesados (HAZRA et al., 2012). Os metais pesados adsorver-se principalmente à superfície do solo sob a forma de íons ou a precipitação dos compostos de metal. Ao contrário de contaminantes orgânicos, metais pesados são removíveis a partir do solo através de complexação associada à tensoativo (OCHOA-LOZA et al., 2001) e de permuta iônica (SWARNKAR et al., 2012). Portanto, uma lavagem com concentração de tensoativo e uma bioextração com tensoativo concentrado pode ser aplicado para recuperação de solos contaminados com metais pesados.

Os tensoativos nas soluções de facilitar a solubilização, dispersão e desorção dos contaminantes e permitir a reutilização do solo (HASHIM et al., 2011). Testes de descontaminação foram realizados com diferentes surfactantes sintéticos (ASÇI et al., 2008), mas o desejo de substituir esses compostos com surfactantes naturais levou à investigação sobre o uso de biossurfactantes (SARUBBO et al., 2015). Existem estudos que demonstram o potencial da surfactina, ramnolipídeos e sofrólipídeos na remoção de metais pesados (HERMAN et al., 1995; MULLIGAN et al., 1999; OCHOA-LOZA et al., 2007).

A natureza iônica, biodegradabilidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades superficiais biossurfactantes tornar adequada para a remoção de metais pesados a partir dos sedimentos e do solo. De acordo com Mulligan e Wang (2006), a remoção é possível com diferentes concentrações de biossurfactantes. Wen et al. (2009) estudou a degradação de um ramnolipídeo em solos contaminados pelo cádmio e zinco e descobriu que este composto pode permanecer no solo por tempo suficiente para aumentar a fitoextração dos metais.

A remoção dos metais pelo biossurfactantes iônicos é pensado para ocorrer na seguinte ordem: adsorção do biossurfactante à superfície do solo e a complexação com o metal; separação do metal a partir do solo para a solução; e associação com micelas. Os metais pesados são aprisionados dentro das micelas através de interações eletrostáticas e pode ser facilmente recuperada através de métodos de separação de precipitação ou de membrana (SANTOS et al., 2016).

Biossurfactantes aniônicos criar complexos não-iônicos com metais através de ligações iônicas. Que essas obrigações são mais fortes do que aquelas entre o metal e o solo, o complexo de metal-biossurfactante é separada do solo, devido à redução da tensão interfacial. Biossurfactantes catiônicos pode substituir íons metálicos igualmente carregados através de troca iônica (concorrência para superfícies carregadas negativamente). Micelas de surfactantes podem também ser utilizadas para remover íons metálicos da superfície do solo (SARUBBO et al., 2015)

Biossurfactantes oferecer vantagens indiscutíveis, uma vez que os microrganismos produtores de surfactantes não necessitam para sobreviver em solo contaminado, embora a adição contínua de biossurfactante é necessária no processo (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Biossurfactantes foram também

aplicados em processos de mineração, onde compostos tensoativos produzidos por *Pseudomonas sp.* e *Alcaligenes sp.* são utilizados para a flutuação e a separação de calcite e scheelita, com as taxas de recuperação de 95% para 30% e CaWO_4 para CaCO_3 , ao passo que os reagentes químicos convencionais não são capazes de separar estas duas minerais (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Oves et al. (2013) avaliaram a capacidade biossorção diversos metais pesados por *B. thuringiensis* OSM29, e obtiveram bons resultados para níquel (94%), cobre (91.8%), cádmio (87%). WANGA et al. (2014) em experimentos com um mutante de *B. subtilis* observou a redução de até 96% da presença de metais pesados (cádmio, cromo, cobre, chumbo e níquel) nas plantas expostas aos metais quando associadas ao micro-organismo. Os biossurfactantes também podem auxiliar na remoção de pesados associando-os com plantas, facilitando a entrada dos metais pesados nestes vegetais, algo demonstrado por Almeida et al. (2009) que estudaram o impacto de surfactantes na remoção de Cu por uma planta de pântano salino, a *Halimione portulacoides*. Enquanto os surfactantes sintéticos TX-100 e SDS (dodecilsulfato de sódio) foram favoráveis para Cu colheita e transporte para as raízes, mas não afeta o transporte de Cu no caule e folhas. Os resultados deste estudo sugerem que os tensoativos promovem fitoremediação através de uma alteração na permeabilidade da membrana de células de raiz. Portanto, surfactantes podem promover a dessorção dos metais e da absorção pelas plantas (MAO et al., 2015).

2.10 PERSPECTIVAS INDUSTRIAIS

Em 2012, o mercado global de surfactantes gerou uma receita de 27 bilhões de dólares e é esperado a subir (GEYS et al., 2014). A produção total de surfactantes em 2012 foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas, destas, apenas 3,5 milhões de toneladas das quais foram biossurfactantes (SILVA et al., 2014b). A maioria destes agentes tensoativos é obtida por processos químicos da petroquímica e recursos oleoquímicos. No entanto, o foco na sustentabilidade e na nova legislação ambiental tem levado à busca de surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes, tornando boas as perspectivas de crescimento para o mercado de biotensoativos.

Os valores de mercado dos biossurfactantes variam de cerca de U.S. 10 \$/mg para surfactina pura (98% de pureza), utilizada em pesquisas médicas, a U.S. 24 \$/kg para fórmulas de *emulsan* propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo. Outros surfactantes como os soforolipídeos tem custo de produção de 2 a 5 €/ kg, ramnolipídeos custam U.S. 20 \$/ kg, para produzir num volume de 20 m³, mas apenas U.S. 5 \$/kg, quando produzidos numa escala de 100 m³, colocando-o para mais perto do etoxilato ou do alquil-poliglicósido (U.S. 1-3 \$/ kg) (SANTOS et al. 2016).

A literatura cita vários exemplos que demonstram que com o aperfeiçoamento da tecnologia de produção dos biossurfactantes é possível um aumento de 10–20 vezes da sua produtividade, como demonstrado por Lin et al. (1998) usando cepas de *B. licheniformis* e Zhao et al. (2012) com *B. amyloliquefaciens*, com aumentos de 12 e 10 vezes na produtividade, respectivamente. Contudo, ainda são necessários novos e significativos progressos para tornar essa tecnologia comercialmente viável (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Visando a otimização da produção de biossurfactantes, destacam-se três parâmetros:

- Seleção de matérias-primas de baixo custo, possibilitando o equilíbrio adequado de C, N, P e outros oligo-elementos para maximização do rendimento e o desenvolvimento de cepas de micro-organismos capazes de metabolizar qualquer subproduto residual.
- Bioprocessamento, que pode ser otimizado por meio das condições operacionais do reator e da reciclagem do meio utilizado.
- Isolamento/recuperação do produto: a maioria das tecnologias inicialmente propostas envolvia formas mais elaboradas de purificação e isolamento. A possibilidade de desenvolvimento *in situ* ou a utilização de líquidos metabólicos, ou seja, do biossurfactante bruto, pode, sem dúvida, conduzir a uma redução substancial de custos.

Para um produto biotecnológico tornar-se competitivo e viável para produção em larga escala, é necessário focar principalmente na otimização do

seu bioprocessamento para torná-lo competitivo com os métodos tradicionais. Atualmente, os problemas com a produtividade e os custos de produção elevados impedem a utilização de forma mais generalizada dos surfactantes microbianos (MARCHANT; BANAT, 2012b). A fim de tornar a produção de biossurfactantes comercialmente viável é importante aperfeiçoar cada vez mais os processos de produção a níveis biológicos e de engenharia, visando uma diminuição de custos de produção e aumento nos rendimentos do produto isolado, objetivos possíveis quando utilizam-se matérias-primas de baixo custo; micro-organismos de fácil manipulação; uma concepção adequada dos processos fermentativos industriais; processos de purificação simples e de baixo custo; e por fim, investimentos financeiros (SANTOS et al., 2016).

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

O *screening* de bactérias produtoras de biossurfactante foi realizado com 11 cepas bacterianas que foram isoladas de amostras de água do mar, as quais estavam contaminadas com derivados de petróleo no Complexo Industrial Portuário de Suape, Ipojuca, Pernambuco, Brasil.

3.2 SCREENING DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE

Os isolados bacterianos com potencial de produção de biossurfactante foram selecionados pela sua atividade hemolítica. Para detectar a produção de biossurfactantes capazes de causar a lise dos eritrócitos, 5 µl de células de cada cepa, crescidas em caldo nutritivo a 32°C por 48 h, foram estriadas em uma placa de ágar sangue de ovelha a 5% (Laborclin, Paraná, Brasil) e incubados sob as mesmas condições. O teste foi considerado positivo quando se formou um halo transparente em torno das colônias (BAYOUMI et al., 2010).

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTE

A identificação de quatro isolados, identificados como B1, B2, B3 e B4, foi realizada por técnica de espectrometria de massa utilizando os *softwares Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF) e *MALDI Biotyper* (Bruker Daltonics) (CLAYDON et al., 1996; CHERKAOUI et al., 2010).

A metodologia consistiu na transferência direta de colônias (ALATOOM et al., 2011), em que as colônias de cada isolado foram transferidas de placas de Petri contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) para a chapa de aço polida 384 (Bruker Daltonics). Adicionou-se ácido fórmico a 70% (1 µL) e secou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Subsequentemente, 1 µl de matriz MALDI (solução saturada de ácido α-

ciano-4-hidroxicinâmico [Bruker Daltonics], acetonitrilo [50%] e ácido trifluoroacético [2,5%]) foi aplicada a cada amostra e novamente secada em temperatura ambiente (ALATOOM Et al., 2011). O *Protein Calibration Standard I* (Bruker Daltonics) foi utilizado como um calibrador. Finalmente, a placa foi introduzida no *Bruker Daltonics Autoflex III Smartbeam* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para obter os espectros.

Os isolados que não puderam ser identificados pela técnica descrita acima foram submetidos à extração de DNA genômico através do uso do Kit de Sangue e Tecidos DNeasy (Qiagen), de acordo com os procedimentos técnicos elaborados pelo fabricante.

Os espectros de massa obtidos foram comparados com os espectros previamente depositados na base de dados de *software Biotyper MALDI 2.0* (Bruker Daltonics) para a identificação do gênero bacteriano e/ou das espécies dos isolados B2, B3 e B4.

O material genético do isolado B1 foi submetido à metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) contendo os oligonucleotídeos universais (*forward* 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; *reverse* 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (SKWOR et al., 2014), que amplificam um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases da região codificadora de rRNA 16s (SRINIVASAN et al., 2015).

As reações foram realizadas utilizando PCR Master Mix [1x] (Promega), utilizando 100 µg do DNA alvo e 20 pmol de cada oligonucleotídeo, num volume final de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). O programa de amplificação correspondia a uma desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, o recozimento dos oligonucleotídeos a 52 °C durante 45 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto (cada ciclo), terminado por extensão a 72°C durante 6 minutos.

As ampliações foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose, purificadas por ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Affymetrix) e sequenciadas em ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram

comparadas com a base de dados GenBank utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

3.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As culturas foram mantidas em tubos inclinados com ágar nutritivo a 4°C. Para preparar o inóculo, uma amostra da cepa crescida por 24h em ágar nutriente foi transferida para 50 ml de caldo nutriente. A condição de cultivo para o pré-inóculo foi 28°C, 150 rpm e 10-14 h de tempo de incubação, até atingir a DO 0,7 (densidade óptica) a 600 nm, correspondente a um inóculo de 10^7 UFC/ml.

3.5 MEIOS E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Para a fermentação líquida, inseriu-se o inóculo, numa quantidade equivalente a 5% do volume do meio, num frasco de 500 ml contendo 100 ml de meio mineral constituído por 0,02% de K_2HPO_4 , 0,06 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01% NaCl, 0,02% KCl, 0,65% Tris (hidroximetil) aminometano e 0,05% de extrato de levedura. O pH do meio foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$. O isolado foi cultivado durante 48h a 28°C com agitação a 200 rpm. Para fins de otimização, todos os experimentos foram realizadas em frascos de 500 ml contendo 100 ml de meio variando um parâmetro de cada vez mantendo os demais parâmetros constantes. No final da fermentação, as amostras foram retiradas da cultura líquida para determinar a tensão superficial e a produção de biossurfactante.

3.6 INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Para estudos do efeito da fonte de carbono na produção de biossurfactante, o meio foi suplementado individualmente com glicose, óleo de soja e óleo de soja residual de fritura à concentração de 2% (p/v). Utilizando a fonte de carbono mais apropriada, foram avaliadas as seguintes fontes de nitrogênio a 0,12% (p/v): nitrato de sódio, cloreto de amônio, uréia e peptona. Após o estabelecimento do meio, foram avaliados os efeitos de diferentes condições de fermentação na produção de biossurfactante. Os fatores estudados

foram: efeito do tempo de cultivo (48, 72 e 96 horas) e velocidades de agitação (150, 200 e 250 rpm). Após seleção da melhor composição de meio e condições de cultivo, a cinética de crescimento de micro-organismos e a produção de biossurfactante foram monitoradas durante 48h. Em intervalos regulares foram avaliados diferentes parâmetros do processo, tais como crescimento, pH, tensão superficial e concentração de biossurfactante.

3.7 ESTUDOS DE *SCALE UP* DE PRODUÇÃO

A produção de biossurfactantes foi realizada em biorreatores de 1,2 L (Tec-Bio-Plus, Tecnal Ltda., Brasil), 3,0 L (Tec-Bio-Plus, Tecnal Ltda., Brasil), e 50,0 L (MA502, Marconi Ltda., Brasil) contendo um volume de 0,6; 1,5 e 20 L, respectivamente, operados em modo batelada, com temperatura controlada (28 °C), numa agitação de 250 rpm, sob uma taxa de aeração de 1,0 vvm, por 48 horas. Ao meio mineral suplementado com 2% de óleo de soja residual de fritura e 0,12% de peptona, foi adicionado o inóculo, na D.O 0,7. As amostras foram coletadas no final da fermentação para verificar a produção de biossurfactante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata

3.8 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

O crescimento do micro-organismo foi acompanhado através do peso seco, obtido após a centrifugação do líquido metabólico a 5000 x g por 30 min e posterior secagem da biomassa em estufa a 105 °C até o peso ficar constante.

3.9 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

O índice de emulsificação (EI) foi medido utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987), fazendo-se uma mistura de 2 ml do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação (5000 x g/30 min), com 2 ml de um composto hidrofóbico (óleo de motor, óleos vegetais de milho e de soja) submetida a vórtex por 2 min. Os tubos foram mantidos estáticos durante 24 h para estabilizar a emulsão e o índice de emulsificação (EI) foi calculado como se

segue: $EI = \text{altura da camada emulsionada (mm)} / \text{altura total da coluna líquida (mm)}] \times 100$.

3.10 TENSÃO SUPERFICIAL E INTERFACIAL E DETERMINAÇÃO DA CMC

A tensão superficial foi avaliada através do método do anel usando um tensiômetro Sigma 700 (KSV Instruments Ltd., Finlândia), utilizando o líquido metabólico livre de células obtido por centrifugação do material fermentado a $5000 \times g$ durante 20 min em temperatura ambiente. A tensão interfacial contra n-hexadecano foi medida da mesma forma. O anel de platina ficou imerso no líquido metabólico, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido (tensão superficial) ou líquido-líquido (tensão interfacial). A concentração crítica de micelas (CMC) foi determinada medindo as tensões superficiais de diluições de biossurfactante isolado em água destilada até um valor constante de tensão superficial. Permitiu-se que a estabilização ocorresse até o desvio padrão, de 10 medições sucessivas, ser inferior a 0,4 mN/m. Cada resultado foi a média de 10 medições após a estabilização. O valor de CMC determinada da tensão superficial com a concentração de biossurfactante. Determinou-se o valor da CMC em mg/L de biossurfactante.

3.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE

O efeito da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) na atividade do biossurfactante foi investigada, utilizando o líquido metabólico livre de células. Adicionou-se uma concentração específica de NaCl (2-10%, p/v) e determinou-se a tensão superficial e a atividade de emulsificação, anteriormente descritas. O líquido metabólico livre de células foi também mantido a uma temperatura constante (5, 70, 100 e 120°C) durante 60 min, além disso, submeteu-se o líquido à temperatura de 90°C em diferentes tempos (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 min), em todos os casos fizeram-se medidas de tensão superficial e emulsificação. O efeito do pH na tensão superficial e na emulsificação foi avaliado após ajuste do pH do líquido metabólico para 2, 4, 6, 8, 10 e 12 com NaOH ou HCl 6,0M.

3.13 ISOLAMENTO DO BIOSSURFACTANTE

O biossurfactante foi extraído do líquido metabólico após remoção de células por centrifugação a 5000 x g durante 30 min. O pH do sobrenadante foi ajustado para 2,0 com HCl 6,0M, e foi adicionado um volume igual de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). Agitou-se vigorosamente a mistura durante 15 min e deixou-se em repouso até à separação de fases. A fase orgânica foi removida e a operação foi repetida duas vezes novamente. Concentrou-se o produto a partir das fases orgânicas reunidas utilizando um evaporador rotativo. O produto amarelado viscoso obtido foi dissolvido em metanol e concentrado novamente por evaporação do solvente a 45°C (IBRAHIM et al., 2013).

3.14 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Depois de se isolar o biossurfactante, dissolveu-se uma amostra de 0,1 g em metanol e analisou-se por cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de sílica gel (G60, Merck, Alemanha) para calcular o fator de retenção (R_f), por exemplo. Os cromatogramas foram desenvolvidos com hexano: acetona (7:3, v/v) e a detecção foi feita por vaporização com anisaldeído seguido de aquecimento por 1 minuto a 110°C.

3.15 DETERMINAÇÃO DO CARÁTER IÔNICO DO BIOSSURFACTANTE

A carga iônica do biossurfactante foi determinada utilizando a técnica de difusão em ágar (MEYLHEUC et al., 2001). Foram feitas duas filas de poços regularmente espaçadas num ágar de baixa dureza (ágar a 1%). Os poços de uma linha foram cheios com a solução de biossurfactante e os dos outros foram cheios com um composto puro de carga iônica conhecida. A substância aniônica escolhida foi dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 mM e a catiônica foi cloreto de bário, 50 mM. O aparecimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativo do carácter iônico do biossurfactante, foi monitorizado durante um período de 48 horas à temperatura ambiente.

3.16 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE ^1H E ^{13}C

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C do biossurfactante purificado foram realizadas num espectrômetro Buker INOVA 500 MHz (Varian). Os espectros foram obtidos a partir de 20 mg de biossurfactante purificado dissolvido em 500 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Sigma Co.) a 300 MHz e 298,1 K. Os desvios químicos (δ) são dados na escala de ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS).

3.17 CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

A composição em ácidos graxos do extrato bruto de biossurfactante foi analisada por GC-FID (CP-3380, Varian Inc., Califórnia, EUA) de éteres metílicos de ácidos graxos. As análises foram realizadas num cromatógrafo de gás equipado com a coluna capilar HR-SS-10. O gás transportador era de hélio a 24 ml/min. A temperatura do injetor e detector (FID) foi 250°C, temperatura do forno a 130°C, iniciando e aumentando para 170°C a 1°C / min, para 180°C a 3°C / min, mantida isotermicamente durante 10 min.

3.18 TESTE DE DISPERSÃO DE ÓLEO

O teste de dispersão de óleo é um método usado para medir o diâmetro da zona livre, que ocorre após a adição de uma solução contendo surfactante numa interface óleo-água. O diâmetro binomial permite uma avaliação da eficiência de redução da tensão superficial de um biossurfactante. Este ensaio foi feito adicionando 50 ml de água do mar a uma placa de Petri com um diâmetro de 15 cm. Depois disso, derramou-se 10 ml de óleo de motor na superfície da água, seguindo da adição de 1 ou 10 ml de líquido metabólico livre de células (biossurfactante bruto) sobre a camada de óleo. O biossurfactante isolado na sua CMC e a uma concentração de 5% também foi testado. Os resultados foram considerados positivos quando o biossurfactante ao entrar em contato com o óleo na superfície da água dispersou o hidrocarboneto formando halos claros. Os diâmetros das zonas claras, em triplicata, foram determinados após 30 segundos

da ação do agente tensoativo, com um controle negativo utilizando 10 ml de água do mar (RODRIGUES et al., 2006; PORNSUNTHORNTAWEE et al. , 2008).

3.18 BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DO MOTOR

Foram realizaram experimentos de biodegradação de óleo de motor em frascos de erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de água do mar e 1% de óleo de motor. O meio de água de mar esterilizado mais óleo de motor foi inoculado com 5% de 10^7 UFC/ml do micro-organismo selecionado. Os frascos foram incubados a 28°C num agitador rotativo a 150 rpm. Os experimentos foram conduzidos em quatro condições diferentes como se segue:

- Condição 1: água do mar + óleo de motor + células bacterianas;
- Condição 2: água do mar + óleo de motor + células bacterianas + biossurfactante (na CMC);
- Condição 3: água do mar + óleo de motor + células bacterianas + biossurfactante (duas vezes a CMC);
- Condição 4: água do mar + óleo bruto (controle).

As amostras foram retiradas no 9^o e 27^o dias para estimação da degradação do óleo motor por análise gravimétrica. O óleo de motor residual foi extraído com hexano num funil de separação. A extração foi repetida duas vezes para assegurar a extração completa. Após extração, o béquer, previamente pesado, contendo o extrato foi levado para um forno de ar quente a 68-70°C, para evaporação do hexano, então o béquer foi resfriado e pesado. O controle sem células foi incubado sob condições semelhantes. A porcentagem (%) de degradação foi calculada como se segue (OLOKE; GLICK, 2005):

% de degradação = [quantidade de óleo do motor degradado / quantidade de óleo de motor adicionado no meio] x 100.

3.20 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

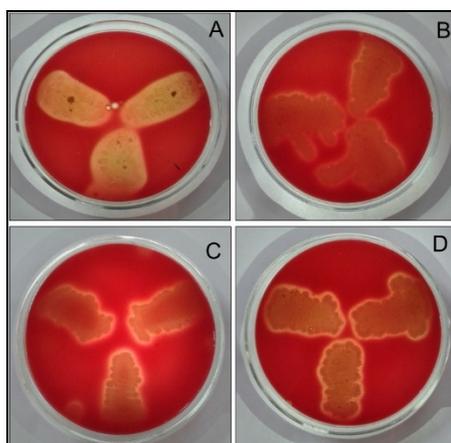
As análises foram realizadas em triplicata. Médias e erros padrão foram calculados usando o Microsoft Office Excel 2003 (Versão 7).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICRO-ORGANISMOS

A atividade hemolítica esta relacionada com as propriedades anfipáticas dos biossurfactantes, sendo um fator preditivo para detecção primária da produção dessas biomoléculas, principalmente em bactérias (CARRILLO et al., 1996). As onze cepas inicialmente isoladas foram submetidas à avaliação da produção de biossurfactante pela determinação da atividade hemolítica. Das colônias testadas, apenas quatro, apresentaram zonas de β -hemólise (Figura 5), com a formação de um halo ao redor da colônia, indicativo da presença de biossurfactante. Esses isolados foram identificados como B1, B2, B3 e B4.

Figura 5: Halos indicando a produção de biossurfactante. Micro-organismos isolados B1(A), B2(B), B3(C) e B4(D).



Youssef et al. (2004) observou que o teste de atividade hemolítica nem sempre coincide com a produção de biossurfactante porque outros produtos microbianos, tais como fatores de virulência que ocasionam lise no ágar sangue e biossurfactantes que tem dificuldade de difusão, podem não lisar as células do sangue. No entanto, a detecção da atividade hemolítica tem sido extensivamente utilizada como um método primário de *screening* para novos isolados que produzem biotensoativos (ALVAREZ et al., 2015).

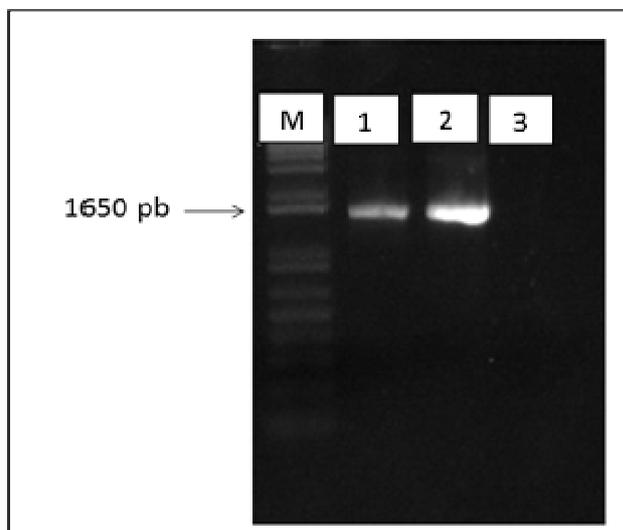
Os resultados obtidos demonstraram que o isolado B1 apresentou a maior zona hemolítica; entretanto, com base nas informações descritas para o teste de hemólise, decidiu-se utilizar os 4 isolados nos experimentos de influência das fontes de carbono e nitrogênio, visando observar a produção do biossurfactante para então selecionar o maior produtor de biossurfactante.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

O isolado B1 foi identificado utilizando o sequenciamento 16S de rRNA. A análise demonstrou claramente que o isolado B1 pertencia à classe Bacilli e é membro do gênero *Bacillus* (Figura 6). Apresentou a máxima semelhança com a sequência 16S de rRNA de *B. amyloliquefaciens* S499 (GenBank: CP014700.1, genoma completo), UMAF6614 (GenBank: CP006960.1, genoma completo), UMAF6639 (GenBank: CP006058.1, genoma completo) (99 % de similaridade de sequências), *B. velezensis* M75 (GenBank: CP016395.1, genoma completo), D2-2 (GenBank: CP014990.1, genoma completo) (99% de similaridade de sequência), *B. subtilis*, *B. vallismortis*, *B. Metilotrófico*, *B. siamensis* e *B. cereus* (99% de similaridade de sequência, sequência parcial).

A análise MALDI-TOF também foi realizada (em duplicata), porém não foi possível identificar o isolado por meio desta metodologia, uma vez que o valor do escore apresentou uma identificação não confiável. Adicionalmente, para identificar fenotipicamente o isolado, foram realizados vários testes bioquímicos para diferenciar as espécies relatadas. Contudo, não foi possível diferenciar fenotipicamente o isolado em espécie, uma vez que o isolado apresentou o mesmo perfil fenotípico na análise. Diferenciar espécies dentro do complexo de *Bacillus*, para análise filogenética do gene 16S rRNA, é difícil considerando a natureza altamente conservada do gene (ROONEY et al., 2009). *Bacillus velezensis*, descrito por Ruiz-Garcia et al. (2005), foi isolada da foz do rio Vélez em Málaga (sul de Espanha) e *B. amyloliquefaciens*, isolada do solo, foi identificada pela primeira vez por Fukumoto (1943a,b). A maior parte da produção mundial de α -amilase e protease são realizadas por *B. amyloliquefaciens* (HARWOOD, 1992). Além disso, *B. amyloliquefaciens* está intimamente relacionado com *B. subtilis* (PRIEST, 1977; WANG et al., 2008).

Figura 6: Gel representativo do produto de amplificação da PCR de aproximadamente 1500 pares de bases da região codificadora do rRNA 16s (isolado B1) . (A) Coluna M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Coluna 1- Controle positivo. Coluna 2- produto de amplificação da PCR (B1). Coluna 3- Controle negativo



Os isolados B2, B3 e B4 foram identificados como *Bacillus cereus*. A identificação foi realizada com base numa comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros previamente depositados no banco de dados Biotyper MALDI 2.0 (Bruker Daltonics). As estirpes foram então diferenciadas utilizando os seguintes códigos: *B. cereus* BCS1 (Isolado 2), *B. cereus* BCS2 (Isolado 3) e *B. cereus* BCS3 (Isolado 4).

B. cereus é uma bactéria gram-positiva formadora de esporos que apresenta respiração aeróbica facultativa. Esta bactéria apresenta uma relação fenotípica e genotípica (16S rRNA), muito próxima a outras espécies de *Bacillus* e é amplamente observada no ambiente (ARNESEN et al., 2008; BOTTONE, 2010). A matéria orgânica em decomposição, o trato intestinal dos invertebrados, as águas frescas e marinhas, os vegetais e os fômites são os reservatórios ambientais naturais para *B. cereus* (JENSEN et al., 2003; BOTTONE, 2010).

4.3 EFEITOS DE FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Os quatro isolados foram capazes de crescer com todas as fontes de carbono testadas (glicose, óleo de soja e óleo de soja residual de fritura) e reduzir

a tensão superficial do meio. Cada micro-organismo apresentou diferentes valores de tensão superficial na presença de diferentes fontes de carbono (Tabela 2). Os biossurfactantes produzidos pelos isolados B1 e *B. cereus* BCS2 obtiveram redução de tensões superficiais na presença de glicose ($\approx 28,7$ mN/m e $\approx 42,4$ mN/m, respectivamente). Para *B. cereus* BCS1, a redução da tensão superficial foi maior quando se usou óleo de fritura ($\approx 44,4$ mN/m). Para *B. cereus* BCS3, a maior redução ocorreu no meio contendo óleo de soja ($\approx 38,7$ mN/m).

Variações na produção de biossurfactantes também foram observadas entre as diferentes cepas e fontes de carbono (Tabela 3). O isolado B1 atingiu a maior produção na presença de óleo de fritura ($\approx 2,5$ g/L). Os rendimentos de *B. cereus* BCS1, *B. cereus* BCS2 e *B. cereus* BCS3 foram maiores quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono (2,8; 1,9 e 1,1 g/L, respectivamente).

A fonte de carbono mais adequada para a produção de biossurfactante foi selecionada com base na tensão superficial e resultados de rendimento. Com exceção de *B. cereus* BCS2, a maior quantidade de biossurfactante produzido não estava de acordo com o menor valor de tensão superficial obtido para os isolados. Isto sugere que diferentes tipos de biossurfactantes com propriedades diferentes são sintetizados dependendo do microrganismo e da fonte de carbono utilizada. Contudo, Pereira et al. (2013) verificaram que os menores valores de tensão superficial correspondiam à maior produção de biossurfactante para três linhagens de *B. subtilis*.

O óleo de fritura residual foi selecionado como a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactante pelo isolado B1. Embora a tensão superficial tenha sido menor na presença de glicose, o óleo residual de fritura levou a um maior rendimento e é uma fonte de carbono de baixo custo. De fato, a escolha de um substrato dispendioso é um dos principais fatores limitantes relacionados ao uso de biossurfactantes em larga escala, como no caso de aplicações ambientais. O óleo de soja foi selecionado como a melhor fonte de carbono para *B. cereus* BCS1 e *B. cereus* BCS3. Em estudos conduzidos por Abouseoud et al. (2008), óleo de soja também foi selecionado para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens*. A glicose foi escolhida como a melhor fonte de carbono para *B. cereus* BCS2. Vários autores relatam menores valores de tensão superficial usando glicose ou sacarose (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997a;

DASTGHEIB et al., 2008; JOSHI et al., 2008a) como a única fonte de carbono. Em contraste, o uso de hidrocarbonetos como única fonte de carbono resulta muitas vezes na ausência de produção de biossurfactante (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008; MAKKAR E CAMEOTRA, 1997b; JOSHI et al., 2008a). Gudiña et al. (2012) observaram que a combinação de uma fonte de carbono solúvel em água (sacarose) e um hidrocarboneto (n-hexadecano) não teve um efeito negativo na produção de biossurfactante por isolados de *B. subtilis*.

Tabela 2: Efeito da fonte de carbono na redução da tensão superficial com biossurfactantes produzidos por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão)

<i>Bacillus</i> isolados	Tensão superficial (mN/m)		
	Glicose	Óleo de soja	Óleo residual de fritura
<i>Bacillus</i> sp.	28,73 \pm 0,10	32,4 \pm 0,21	31,33 \pm 0,22
<i>B. cereus</i> BCS1	51,00 \pm 1,04	45,08 \pm 0,98	44,45 \pm 0,71
<i>B. cereus</i> BCS2	42,43 \pm 2,01	51,05 \pm 1,01	51,50 \pm 0,31
<i>B. cereus</i> BCS3	48,57 \pm 0,98	38,7 \pm 0,41	43,45 \pm 0,31

Tabela 3: Efeito da fonte de carbono na produção de biossurfactantes (mg/L) por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão)

<i>Bacillus</i> isolados	Produção de biossurfactante (mg/L)		
	Glicose	Óleo de soja	Óleo residual de fritura
<i>Bacillus</i> sp.	510 \pm 23	240 \pm 26	2500 \pm 100
<i>B. cereus</i> BCS1	2510 \pm 49	2410 \pm 96	1770 \pm 96
<i>B. cereus</i> BCS2	1910 \pm 99	200 \pm 51	90 \pm 29
<i>B. cereus</i> BCS3	1200 \pm 59	510 \pm 41	240 \pm 51

4.4 EFEITOS DE FONTES DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE

Há evidências de que o nitrogênio desempenha um papel importante na produção de compostos de superfície ativos por micro-organismos. Assim, após a seleção da fonte de carbono, realizaram-se experimentos para a seleção da fonte de nitrogênio utilizando cloreto de amônio, nitrato de sódio, ureia e peptona separadamente. As Tabelas 4 e 5 mostram respectivamente a tensão superficial e os resultados de rendimento para cada meio de produção contendo a fonte de carbono previamente selecionada e diferentes fontes de nitrogênio.

Tabela 4: Efeito da fonte de nitrogênio na redução da tensão superficial (mN/m) com biossurfactantes produzidos por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão)

<i>Bacillus</i> isolados	Tensão superficial (mN/m)			
	Cloreto de amônio	Nitrato de sódio	Uréia	Peptona
<i>Bacillus</i> sp.	31,01 \pm 0,41	32,40 \pm 1,91	31,33 \pm 0,35	29,50 \pm 0,21
<i>B. cereus</i> BCS1	47,15 \pm 1,21	40,04 \pm 1,37	39,18 \pm 0,80	50,01 \pm 0,56
<i>B. cereus</i> BCS2	37,01 \pm 1,33	46,02 \pm 2,03	41,60 \pm 0,32	47,03 \pm 0,31
<i>B. cereus</i> BCS3	40,29 \pm 2,00	38,50 \pm 1,07	38,00 \pm 0,22	41,08 \pm 0,50

Tabela 5: Efeito da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante (mg/L) produzidos por isolados de *Bacillus* cultivados em meio mineral (dados expressos como média \pm desvio padrão)

<i>Bacillus</i> isolates	Produção de biossurfactante (mg/L)			
	Cloreto de amônio	Nitrato de sódio	Uréia	Peptona
<i>Bacillus</i> sp.	700 \pm 25	800 \pm 90	1220 \pm 96	2400 \pm 83
<i>B. cereus</i> BCS1	500 \pm 17	110 \pm 56	210 \pm 55	250 \pm 41
<i>B. cereus</i> BCS2	2710 \pm 94	800 \pm 44	510 \pm 43	5110 \pm 79
<i>B. cereus</i> BCS3	1700 \pm 73	2250 \pm 100	2910 \pm 77	2500 \pm 91

Com o biossurfactante produzido pelo isolado B1 utilizando peptona como fonte de nitrogênio, a tensão superficial do meio foi reduzida para

aproximadamente 29,6 mN/m e o rendimento foi de 2400 mg / L. Com as três cepas de *B. cereus*, obtiveram-se os melhores resultados de tensão superficial quando se utilizou ureia, mas somente BCS3 teve um maior rendimento de biossurfactante também na presença desta fonte de nitrogênio. *B. cereus* BCS1 demonstrou pouca produção de biossurfactante com todas as fontes testadas, o que não ocorreu quando o micro-organismo foi inicialmente cultivado na presença de extrato de levedura.

Com relação ao rendimento, os presentes resultados estão de acordo com resultados envolvendo cepas de *Bacillus* presentes na literatura. Pereira et al. (2013) descrevem rendimentos de 844, 755 e 2158 mg/L para os isolados # 309, # 311 e #573, respectivamente. Outros autores relataram produção de biossurfactante bruto variando de 720 a 1120 mg/L (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997a; ABDEL-MAWGOUD et al., 2008). Bezza et al. (2015) encontraram um rendimento de 7150 mg/L utilizando *B. subtilis* CN2 cultivado num meio contendo 6% de glicerol. Gudiña et al. (2015) relatam a produção de aproximadamente 1300 mg/L por *B. subtilis* da cepa #573 usando um meio de cultura contendo 10% de licor de milho e Rahman et al. (2006) relatam produção de 4000 mg/L de iturina por cepas de *B. subtilis*.

Deve ser destacado que quantidades maiores de biossurfactante não estão necessariamente relacionadas com melhores propriedades do tensioativo. É possível que uma cepa específica produza quantidades maiores de biossurfactante, mas não reduza a tensão superficial tanto quanto outros isolados, como demonstrado na presente investigação.

A literatura mostra que altas razões C/N (níveis reduzidos de nitrogênio no meio) limitam o crescimento bacteriano e favorecem o metabolismo celular com a produção de metabólitos. Em contrapartida, um excesso da fonte de nitrogênio direciona o substrato para a síntese de material celular, limitando relativamente o acúmulo de produtos (SANTOS et al., 2016). Nesse trabalho, uma relação C/N de 16,6 foi utilizada com o objetivo de intensificar a produção de biossurfactante.

Resultados diferentes são descritos na literatura sobre a fonte de nitrogênio. Abdel-Mawgoud et al. (2008) relatam a maior produção de surfactina pelo isolado BS5 de *B. subtilis* utilizando nitrato de sódio e nitrato de amônio

como fontes de nitrogênio. Outros autores relatam uma alta produção de biossurfactante por cepas de *B. subtilis* usando ureia (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997a; GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011). Algumas cepas de *Bacillus* não utilizam sulfato de amônio para crescimento ou produção de biossurfactante, mas podem usar nitrato de amônio, nitrato de potássio ou nitrato de sódio (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997a).

Tendo em conta a quantidade de biossurfactante produzido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, o isolado B1 cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo de fritura e 0,12% de peptona foi selecionado para experiências adicionais.

4.5 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Após a seleção do micro-organismo e da composição do meio, os efeitos da agitação e do tempo de cultivo sobre a concentração de biossurfactante e a redução na tensão superficial, foram testados a 150, 200 e 250 rpm e após 48, 72 e 96 horas, respectivamente, como mostrado nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Efeito da agitação e tempo de cultivo na redução da tensão superficial (mN/m) por biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral contendo 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona (dados expressos como média \pm desvio padrão)

VARIÁVEL	48 h	72 h	96 h
150 rpm	28,35 \pm 0,20	31,72 \pm 0,00	31,25 \pm 0,20
200 rpm	28,08 \pm 0,70	29,61 \pm 0,40	30,49 \pm 1,20
250 rpm	28,55 \pm 0,00	31,09 \pm 0,20	30,15 \pm 0,10

Os resultados demonstraram que o aumento do tempo de cultivo para 72 e 96 h favoreceu um aumento na tensão superficial, enquanto a velocidade de agitação não teve efeito significativo (Tabela 6). Joshi et al. (2015) também encontraram a produção máxima de biossurfactante por *B. licheniformis* entre 48 e 36 horas de cultivo. Os resultados demonstraram uma quantidade maior de

biossurfactante produzido após 48 horas a uma velocidade de 250 rpm (Tabela 7) e estas condições de cultura foram escolhidas para experimentos posteriores.

Tabela 7: Efeito da agitação e tempo de cultivo na produção de biossurfactante (mg/L) produzido por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral contendo 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona (dados expressos como média \pm desvio padrão)

Variável	48 h	72 h	96 h
150 rpm	2000 \pm 0	1720 \pm 30	2200 \pm 10
200 rpm	1300 \pm 20	900 \pm 10	1260 \pm 20
250 rpm	3520 \pm 20	2190 \pm 0	1870 \pm 70

O aumento no tempo de incubação resultou em uma diminuição na produção de biossurfactante, que pode ser devido ao esgotamento de nutrientes e alterações metabólicas no meio. A velocidade de agitação é um fator determinante na mistura das fases aquosa e oleosa bem como na transferência de massa de oxigênio em culturas utilizando frascos agitados. Assim, a velocidade de agitação pode ter influenciado a produção de biossurfactante pela cepa, promovendo uma mistura de fase e/ou uma taxa de transferência de oxigênio adequada para uma produção mais eficaz a 250 rpm.

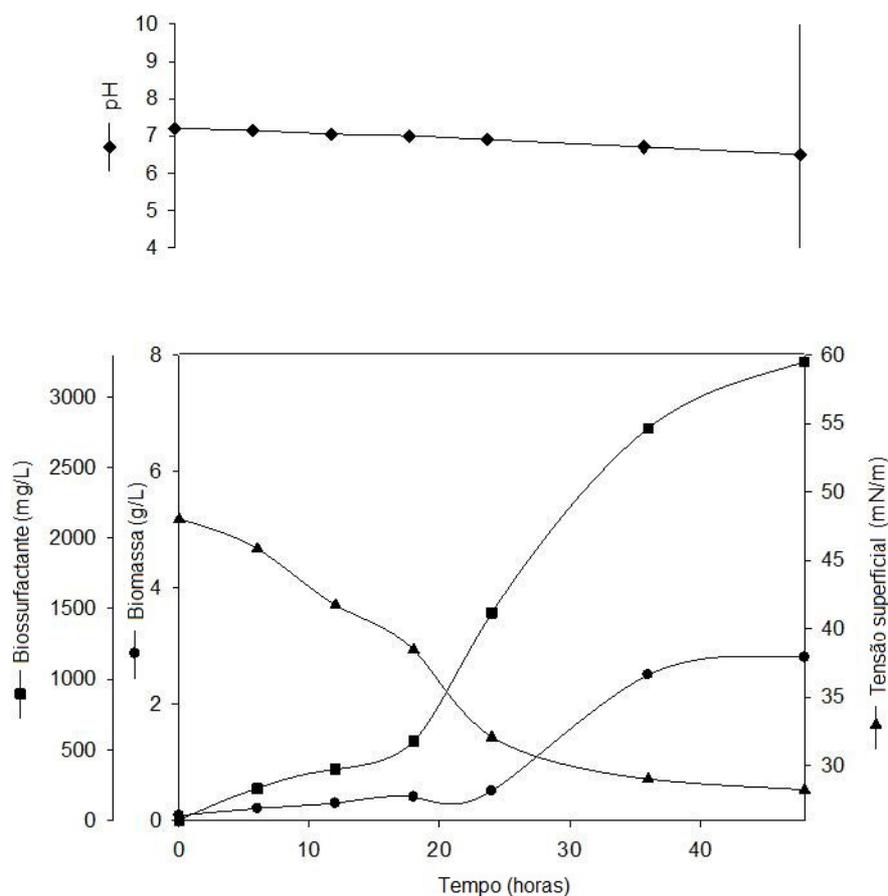
Avaliando a produção de biossurfactante por *B. licheniformis*, El-Sheshtawy et al. (2015) obtiveram os melhores resultados após 72 h. Para *B. brevis*, Mouafi et al. (2016) relatam resultados satisfatórios usando tempos de incubação de 72 a 168 horas, com melhores resultados obtidos durante o maior tempo de incubação. Em contraste, Jadhav et al. (2013) obtiveram a máxima produção de biossurfactante por *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolado da água do mar antártica no final das 48 h.

4.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Após a seleção das melhores condições de meio e cultura, foi realizada a cinética de crescimento e de produção de biossurfactante para *Bacillus* sp cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e

0,12% de peptona. As amostras foram coletadas ao longo de um período de 48 h (Figura 7).

Figura 7: Perfil de crescimento, pH, tensão superficial e concentração de biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivada em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h



As curvas cinéticas revelaram relações entre a produção de biossurfactante, o crescimento celular e a redução da tensão superficial. A produção de biossurfactante iniciou-se logo após a inoculação do micro-organismos no meio de cultivo e aumentou até 48 h, quando atingiu a concentração máxima de biossurfactante (3260 mg/L). Com relação a tensão superficial do meio, houve redução de 50 mN/m para 28 mN/m. Durante o processo a contração máxima de biomassa foi de 2,8 g/L. O pH fermentativo exerce uma influência considerável sobre a velocidade do metabolismo. No presente estudo, o pH mudou pouco durante o cultivo do isolado B1, diminuindo de 7,2 para 6,5 após 48 de cultivo. Os achados indicam que a síntese de

biossurfactante utilizando óleo residual de fritura ocorreu durante a fase de crescimento exponencial, sugerindo que o biossurfactante é produzido como um metabólito primário que acompanha a formação da biomassa celular (cinética associada ao crescimento) (Figura 7).

A literatura descreve diferenças de comportamento quanto aos perfis de crescimento para bactérias do gênero *Bacillus* e à produção de biossurfactantes por esses micro-organismos. Ayed et al. (2015) investigaram a capacidade de *B. amyloquefaciens* An6 degradar e utilizar diesel em um meio mineral. A biomassa da cepa aumentou exponencialmente com o aumento do tempo de incubação até 9 dias, enquanto a tensão superficial diminuiu durante este período. O crescimento de *B. subtilis* LSFM-05 sobre glicerol bruto, por outro lado, foi caracterizado por uma fase de latência de 24 h seguida por uma fase de crescimento exponencial, que estava completa após 48 h de incubação. A concentração máxima de surfactante (1370 mg/L) correspondeu à fase de crescimento máximo, demonstrando a produção relacionada ao crescimento. O pH do meio de cultura aumentou de 6,9 para 8,0 após 48 h de crescimento e diminuiu ligeiramente durante o restante do período de fermentação (FARIA et al., 2011).

Reis et al. (2004) encontraram um aumento nos valores de pH de 6,8 a 7,7 para *B. subtilis* cultivado em glicerol purificado como fonte de carbono. Um aumento nos valores de pH de 5,4 para 7,6 foi também relatado por Barros et al. (2008) para *B. subtilis* LB5 cultivada em águas residuais de mandioca como substrato, que produziu um biossurfactante que reduziu a tensão superficial da água de 72,31 para 27,01 mN/m.

Oliveira et al. (2013) descreveram a produção de surfactina (219,99 mg/L) por *B. subtilis* LAMI005 cultivada em meio com suco de caju clarificado. Foi encontrada uma correlação entre a concentração de surfactina e a tensão superficial do líquido metabólico sem células, uma vez que uma diminuição expressiva (menor que 30 mN/m) na tensão superficial foi observada quando a concentração de biossurfactante ultrapassou 120 mg/L. Ramírez et al. (2015) descreveram a produção de surfactina por *B. subtilis* com 2% de resíduos de azeite como única fonte de carbono. O peso seco e a concentração de biossurfactante aumentaram rapidamente na fase de crescimento exponencial e

permaneceram quase constantes na fase logarítmica. A produção de surfactina (3,12 mg/L) parece estar estreitamente associada ao crescimento do organismo, uma vez que a surfactina foi detectada precocemente no meio.

Al-Wahaibi et al. (2013) descreveram a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* cepa B30 em meios à base de melaço. A menor tensão superficial (26,31 mN/m) ocorreu entre 12 e 14 h e não foram observadas alterações significativas no pH durante a fermentação.

Lin et al. (1993) estudaram a cepa de *B. licheniformis* JF-2 e descobriram que um biossurfactante lipopeptídico foi produzido durante o crescimento ativo. Ghosvavand et al. (2008) também encontraram a produção máxima de biossurfactante por *B. subtilis* PTCC 1696 durante a fase de crescimento (10 h), que permaneceu constante mesmo após a fase exponencial. Al-Bahry et al. (2012) relatam um fenômeno semelhante para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* B20 usando melado de tâmaras dentro de 10 a 12 h de fermentação e nenhuma alteração depois disso até 72 h. Uma tendência semelhante de produção de biossurfactante associada ao crescimento pelo isolado B1 foi encontrada no presente estudo, mas com melhores rendimentos.

4.7. ESTUDOS *SCALE UP* DE PRODUÇÃO

O isolamento B1 foi utilizado para os estudos de *scale up* em fermentadores de 1,2; 3,0 e 50 L contendo 0,6; 1,5 e 20 L de meio de produção, respectivamente. A aeração (1,0 vvm), agitação (250 rpm) e temperatura (28°C) foram monitorizados e mantidos constantes durante 48 horas. O líquido metabólico livre de células resultante do processo foi utilizado para a determinação da tensão superficial e do rendimento de biossurfactante e os resultados foram comparados com a produção em frascos (Tabela 8).

Os valores de tensão superficial para o caldo de fermentação não diferiram significativamente quando o biossurfactante foi produzido em frascos ou nos biorreatores de 1,2 e 3,0 L, mas o rendimento aumentou aproximadamente 22 e 31% nas fermentações realizadas nas amostras de 1,2 e 3,0 L, respectivamente, em relação à produção em frascos. Em contraste, não houve

aumento proporcional na produção no biorreator de 50 litros, embora o valor tenha sido maior do que o obtido em frascos

Tabela 8: Tensão superficial e produção de biossurfactante por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h sobre agitação de 250 rpm em frascos e biorreatores (dados expressos como média \pm desvio padrão)

PARÂMETROS	FRASCOS	BIORREACTORES		
		1,2 L	3 L	50 L
Tensão superficial (mN/m)	27,8 \pm 0,2	28,7 \pm 0,3	27,5 \pm 0,1	32,0 \pm 0,5
Produção de biossurfactante (mg/L)	3520 \pm 95	4300 \pm 101	4600 \pm 88	4110 \pm 79

.Os resultados da tensão superficial são semelhantes aos descritos num estudo conduzido por Joshi et al. (2015) utilizando *B. licheniformis* R2 num fermentador de 5 L, em que a tensão superficial foi reduzida para 28 mN/m, embora o rendimento fosse apenas 1100 mg/L. Estudando a produção de um biossurfactante por *B. subtilis* B20 cultivado com melaço em fermentador de 5 L, Al-Bahry et al. (2013) obteve um rendimento de 2290 mg/L. As células imobilizadas de *Bacillus* sp. GY19 em quitosano foram utilizadas num fermentador com uma condição otimizada de 10% de glicerol residual e 1,25% de óleo de palma e produziram 7120 mg/L de um biossurfactante lipopeptídico (KHONDEE et al., 2015). Assim, os resultados descritos na literatura revelam que os valores obtidos no presente estudo foram satisfatórios quando comparados com outros biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus*.

4.8 INFLUÊNCIA DA ESTABILIDADE NA TENSÃO SUPERFICIAL E NA ATIVIDADE DE EMULSIFICANTE

Aplicações em ambientes específicos pode ser um desafio. Um biossurfactante precisa manter suas características tensioativas sob quaisquer condições ambientais. Caso contrário, ele será descartado pela indústria. Assim, o estudo da estabilidade é necessário para a determinação da aplicabilidade de um biossurfactante na melhora da recuperação microbiana de óleo, como Alvarez et al. (2015) apontam em um estudo envolvendo *B. amyloliquefaciens*.

A maioria dos biossurfactantes com potencial de aplicação na indústria petrolífera precisam ser caldos de cultura com células vivas ou preparações brutas, uma vez que são necessários grandes volumes e devem estar de acordo com considerações econômicas. Por conseguinte, investigou-se a aplicação do biossurfactante a partir do isolado B1 na sua forma bruta sem etapas de extração onerosas com base nas medidas de tensão superficial e capacidade de emulsificação, observadas anteriormente, do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante (Tabela 9).

Tabela 9: Influência das concentrações de salina (NaCl), pH, temperatura e tempo de aquecimento a 90 °C na redução da tensão superficial e atividade emulsificante no líquido metabólico livre de células contendo biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h (dados expressos como média \pm desvio padrão)

NaCl (%)	Tensão superficial (mN/m)	EI (%) ^a	EI (%) ^b	EI (%) ^c
2,0	28,56 \pm 0,20	38,9 \pm 5,1	30,3 \pm 5,0	93,5 \pm 2,0
4,0	27,88 \pm 0,19	25,3 \pm 5,0	24,6 \pm 2,1	98,2 \pm 2,0
6,0	27,88 \pm 0,22	29,4 \pm 3,1	28,6 \pm 3,3	98,4 \pm 3,0
8,0	27,94 \pm 0,30	29,0 \pm 4,2	28,4 \pm 4,3	98,2 \pm 3,0
10,0	26,95 \pm 0,20	24,2 \pm 4,3	24,3 \pm 1,0	98,2 \pm 4,0
pH	Tensão superficial (mN/m)	EI (%) ^a	EI (%) ^b	EI (%) ^c
2	29,02 \pm 0,14	54,4 \pm 2,0	53,1 \pm 2,0	98,2 \pm 0,7
4	30,21 \pm 0,23	52,1 \pm 3,0	52,3 \pm 3,0	99,1 \pm 0,9
6	29,12 \pm 0,19	50,2 \pm 3,0	49,5 \pm 1,7	99,1 \pm 0,3
8	27,23 \pm 0,51	47,5 \pm 3,0	47,3 \pm 2,2	98,2 \pm 0,4
10	28,55 \pm 0,25	44,4 \pm 2,0	54,2 \pm 5,1	99,2 \pm 0,0
Temperatura (°C)	Tensão superficial (mN/m)	EI (%) ^a	EI (%) ^b	EI (%) ^c
5	28,26 \pm 0,21	37,0 \pm 2,97	36,3 \pm 3,0	99,1 \pm 0,2
70	28,11 \pm 0,22	43,1 \pm 3,08	40,4 \pm 3,0	92,2 \pm 0,0
100	27,93 \pm 0,31	48,0 \pm 4,09	40,2 \pm 1,3	98,0 \pm 0,1
120	28,01 \pm 0,22	40,0 \pm 4,03	41,3 \pm 3,0	98,0 \pm 0,4
Tempo (min) a 90 °C	Tensão superficial (mN/m)	EI (%) ^a	EI (%) ^b	EI (%) ^c
10	28,25 \pm 0,10	35,0 \pm 2,0	36,0 \pm 1,4	92,1 \pm 1,5
20	28,13 \pm 0,15	30,1 \pm 1,9	30,3 \pm 2,0	90,1 \pm 3,2
30	28,12 \pm 0,09	20,0 \pm 2,0	25,2 \pm 3,0	89,2 \pm 3,0
40	27,76 \pm 0,19	26,0 \pm 2,3	15,1 \pm 1,4	89,2 \pm 2,7
50	28,13 \pm 0,13	5,0 \pm 1,3	5,4 \pm 2,4	90,1 \pm 2,4
60	28,07 \pm 0,15	10,0 \pm 1,2	3,2 \pm 2,9	92,2 \pm 1,3
120	27,81 \pm 0,06	5,0 \pm 1,0	9,0 \pm 1,9	89,1 \pm 2,4

^a Índice de emulsificação de óleo de soja

^b Índice de emulsificação de óleo de milho

^c Índice de emulsificação de óleo de motor

O efeito da salinidade sobre a atividade do biossurfactante foi avaliado para investigar sua aplicabilidade na biorremediação de ambientes marinhos contaminados. A tensão superficial mostrou-se estável, independentemente da concentração de sal, com valores menores que 29 mN/m em todos os ensaios. A atividade de emulsificação do biossurfactante para óleo de motor não variou significativamente, permanecendo entre 95 e 98%. O índice de emulsificação permaneceu entre 22 e 36% para os óleos de soja e milho, com valores maiores quando a concentração salina foi de 2%. Como a salinidade do mar em todo o mundo é de cerca de 3%, o biossurfactante do isolado B1 pode ser aplicado em ambientes salinos.

O biossurfactante também se mostrou estável dentro da gama de pH testada, demonstrando um ligeiro aumento na tensão superficial apenas nos extremos de acidez e basicidade. A menor tensão superficial (27,28 mN/m) ocorreu a pH 8. A atividade de emulsificação foi de 95 a 98% para óleo de motor e de 48 a 53% para os óleos vegetais. Vários relatos confirmam a estabilidade de biossurfactantes em diferentes valores de pH, principalmente em meios alcalinos (GHOJAVAND et al., 2008; JOSHI et al., 2008b, GUDIÑA et al., 2010). Isto pode ser devido à melhor estabilidade de micelas de biossurfactantes de ácidos graxos na presença de NaOH e à precipitação de metabolitos secundários a valores de pH mais elevados. O pH alcalino para a produção e estabilidade do biossurfactante sugere potencial aplicabilidade na indústria de detergente.

O biossurfactante permaneceu estável dentro da faixa de temperatura testada e tempo de exposição a 90 °C, com tensão superficial inferior a 29 mN/m. Esta é uma característica significativa e indica utilidade nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, onde o aquecimento é utilizado com o intuito de esterilizar o material. O índice de emulsificação a diferentes temperaturas permaneceu entre 94 e 98% para o óleo de motor, com índices mais baixos para os óleos vegetais (33 a 48%) (Figura 9C). O tempo de exposição a 90 °C não foi favorável à manutenção da atividade de emulsificação dos óleos vegetais pelo biossurfactante, uma vez que os valores estavam entre 38 e 25% entre 10 e 40 min e entre 10 e 2% entre 50 e 120 min.

Vários estudos confirmam a estabilidade de biossurfactantes em condições extremas de temperatura. Jadhav et al. (2013) realizaram testes com

um biossurfactante produzido por *Oceanobacillus sp.* isolado de água do mar e verificou-se que a atividade de 100% foi mantida a temperaturas entre 30 e 110°C. Outros estudos, como o realizado por Deepika et al. (2016) com *P. aeruginosa*, descrevem testes com as mesmas condições que as avaliadas no presente estudo e relatam estabilidade nas emulsões produzidas com biossurfactantes. Joshi et al. (2008b) descobriram que os biossurfactantes produzidos por quatro diferentes isolados de *Bacillus* permaneceram estáveis durante nove dias a 80 °C. Desai e Banat (1997) descobriram que o tratamento térmico não causou alterações sensíveis nas propriedades de alguns biossurfactantes. De forma semelhante, Borodoli e Konwar (2008) expuseram um biossurfactante produzido por estirpes de *P. aeruginosa* a uma temperatura de 100 °C durante 5 a 60 min e verificaram que a tensão superficial permaneceu inalterada. A surfactina de *B. subtilis* BS-37 mostrou-se bastante estável num ambiente alcalino forte com uma elevada concentração de minerais (Liu et al., 2015).

A estabilidade do biossurfactante produzido no presente estudo pode estar relacionada à origem do microrganismo utilizado para sua produção, uma vez que a bactéria foi isolada da água do mar, que é um ambiente com variações diárias das condições climáticas, tornando-a adaptável a situações específicas.

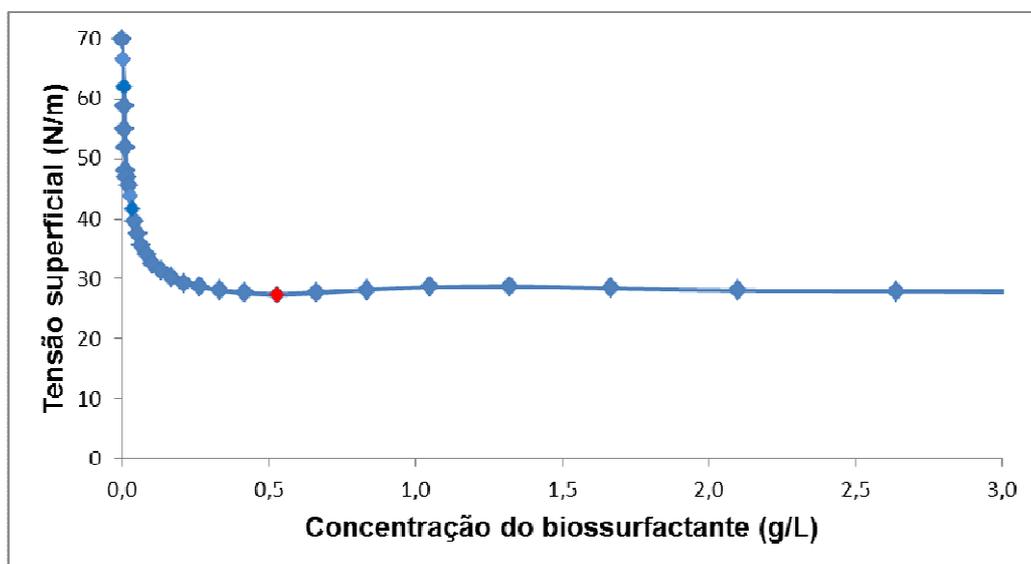
4.9 AS TENSÕES SUPERFICIAL E INTERFACIAL E A CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) DO BIOSSURFACTANTE

As propriedades superficiais de um biossurfactante dependem principalmente da sua capacidade para diminuir as tensões superficiais e interfaciais, a CMC e a formação de emulsões estáveis. A capacidade de reduzir a tensão superficial depende da concentração específica do composto tensoativo. A CMC é definida como a concentração mínima de biossurfactante necessária para a redução máxima da tensão superficial da água e o início da formação de micelas. Os surfactantes eficientes têm valores CMC muito baixos, isto é, é necessário menos tensoativo para diminuir a tensão superficial (SANTOS et al., 2016). No entanto, é importante distinguir entre um biossurfactante eficaz e um biotensoativo eficiente. A eficácia é medida pelo valor mínimo ao qual a tensão

superficial pode ser reduzida, enquanto a eficiência é medida pela concentração do biossurfactante. Além disso, a capacidade de reduzir a tensão superficial abaixo de 35 mN/m é um dos critérios usados para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes (MULLIGAN, 2005). De acordo com Zhang e Miller (1992), a concentração de biossurfactante necessária para atingir o CMC é tipicamente entre 1 e 200 mg/L, enquanto a tensão interfacial (óleo/água) é de cerca de 1 e 30 mN/m (BOGNOLO, 1999) . Diferentes fatores influenciam o tipo e a quantidade de tensioativo (SYLDATK et al., 1985), tais como as condições de crescimento e a disponibilidade de nutrientes no meio.

A tensão superficial foi traçada como uma função da concentração de biossurfactante (Figura 8), demonstrando redução de 70 para 27 mN/m com o aumento do biossurfactante até uma concentração de 500 mg/L e permanecendo constante. Esta CMC difere muito dos 63 mg/L reportados para a surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI005 no suco de maçã de cajú clarificado, com uma tensão superficial de 30 mN/m (OLIVEIRA et al., 2013) e os 20 a 30 mg/L encontrado para biossurfactantes produzidos por três cepas de *B. subtilis* isoladas a partir de óleo bruto brasileiro utilizando meios contendo sacarose, o que reduziu a tensão superficial média para 27,9 a 28,4 mN/m (PEREIRA et al., 2013). Por outro lado, Chen et al. (2012) encontraram uma redução na tensão superficial da água de 72,30 a 25,42 mN/m com uma concentração de 350 mg/L para um biossurfactante de *B. licheniformis* TKU004 cultivado em meio com pó de canela de calamar a 1% como único composto de fonte de carbono/nitrogênio, enquanto que um biossurfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus sp.* I-15 crescido em glicose reduziu a tensão superficial da água de 68 para 42 mN/m a uma concentração de 200 mg/L (ISMAIL et al., 2013). Ayed et al. (2015) descrevem uma CMC de 100 mg/L a 30 mN/m para um biossurfactante de *B. amyloliquefaciens*. Os diferentes valores de CMC podem ser explicados por diferenças na pureza e composição dos biossurfactantes lipopeptídico. No presente estudo, a baixa pureza do biossurfactante pode explicar a diferença nos valores de CMC em comparação com outros biossurfactantes de cepas de *Bacillus* descritos na literatura.

Figura 8: Tensão superficial x concentração de biossurfactante isolado produzido por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h



Foram também descritas variações na CMC da surfactina. A literatura relata que essas variações ocorrem dependendo da natureza do solvente usado para dissolver surfactina bem como da pureza da preparação de surfactina (OLIVEIRA et al., 2013). De acordo com Faria et al. (2011), as diferenças na estrutura de moléculas de surfactina de diferentes cepas de *Bacillus* podem levar a uma pequena diminuição no poder de atividade superficial. Liu et al. (2009) declararam que a esterificação de Glu residual em um lipopeptídeo aumenta a sua potência superficial ativa e demonstrou que a surfactina GluOME-C15 tinha um CMC inferior ao do análogo não metilado. De acordo com Peypoux et al. (1994), demonstrou-se que uma redução no número de carbonos da cadeia lateral lipídica da surfactina induz modificações significativas na disposição do lipopeptídeo na interface.

Uma redução na tensão interfacial indica a capacidade de um biossurfactante para remover óleo de um reservatório. À medida que a tensão interfacial entre óleo bruto e a água é reduzida, a força capilar entre o óleo e a rocha do reservatório também é reduzida. Esta redução leva a uma maior mobilização do óleo no reservatório, o que é de considerável interesse no uso de biossurfactantes para melhorar a recuperação de petróleo em reservatórios maduros (PEREIRA et al., 2013).

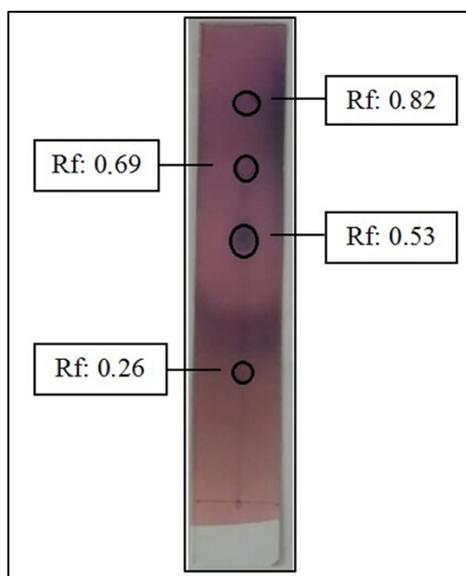
A tensão interfacial do biossurfactante de *Bacillus* sp. foi medida utilizando o líquido metabólico. O biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão interfacial entre o líquido metabólico livre de células e o hexadecano de 40 para 6 mN / m. Este resultado é melhor do que o obtido pela cepa TSBSO 3.8 de *B. amyloliquefaciens*, que produziu um biossurfactante que diminuiu a tensão interfacial para 11,4 mN/m num meio de cultura de caldo de tripticase de soja (ALVAREZ et al., 2015). Verificou-se que os biossurfactantes produzidos por três estirpes de *B. subtilis* reduzem os valores de tensão interfacial para 5 mN/m (PEREIRA et al., 2013). Al-Bahry et al. (2013) descobriram que a surfactina produzida por uma cepa de *B. subtilis* cultivada em melaço reduziu a tensão interfacial entre água e n-hexadecano de 23 a 5 mN/m a uma concentração de 2,2 g/L e, quando foram utilizadas concentrações mais elevadas de biossurfactante, a tensão interfacial foi reduzida para 1 mN/m. Deleu et al. (1999) relata a redução da tensão interfacial dodecano / água para valores de cerca de 2 mN/m usando surfactina produzida por *B. subtilis*, com essa redução maior que a obtida com outros biossurfactantes, como a iturina A (14,94 mN/m) e a fengicina (11,63 mN/m).

4.10 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Os testes de difusão em ágar revelaram quatro linhas de precipitação entre o biossurfactante produzido pelo isolado B1 e o composto iônico selecionado (cloreto de bário), demonstrando a natureza aniônica do biossurfactante nas condições estudadas. Silva et al. (2010) relatam resultados semelhantes para um biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*, que é o tipo de biossurfactante também produzido por bactérias do gênero *Bacillus* (SOUZA et al., 2014).

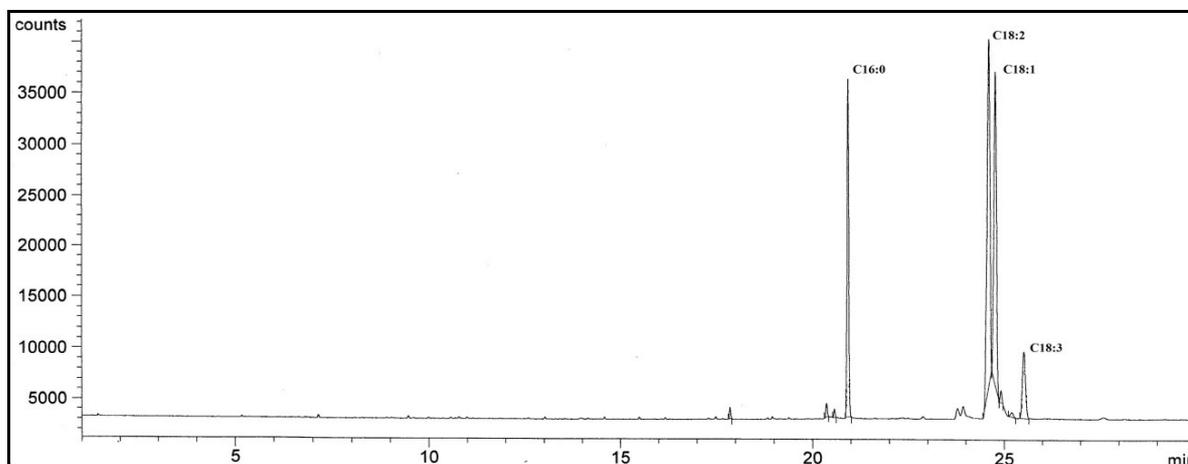
Para as análises realizadas por Cromatografia em Camada Delgada, o perfil da corrida realizada com o sistema hexano-acetona (7:3 v/v) revelou quatro substâncias apolares principais (Figura 9).

Figura 9: Componentes do biossurfactante detectados utilizando cromatografia em camada delgada. As amostras foram adicionadas em volumes de 20 μ L em placas TLC e desenvolvidas com sistema de solvente hexano:acetona (7:3, v/v). A placa de TLC foi pulverizada com anisaldeído, seguido por aquecimento a 110°C durante 1 min



Já para o estudo da composição de ácidos graxos do biossurfactante isolado analisado por cromatografia gasosa revelou a presença de C18: 2 (38,05%) como componente principal seguido de C18:1 (30,21%), C16:0 (20,85%) e C18:3 (7,86%) em pequenas quantidades (Figura 10). Estes resultados corroboram com os quatro grupos polares encontrados na TLC.

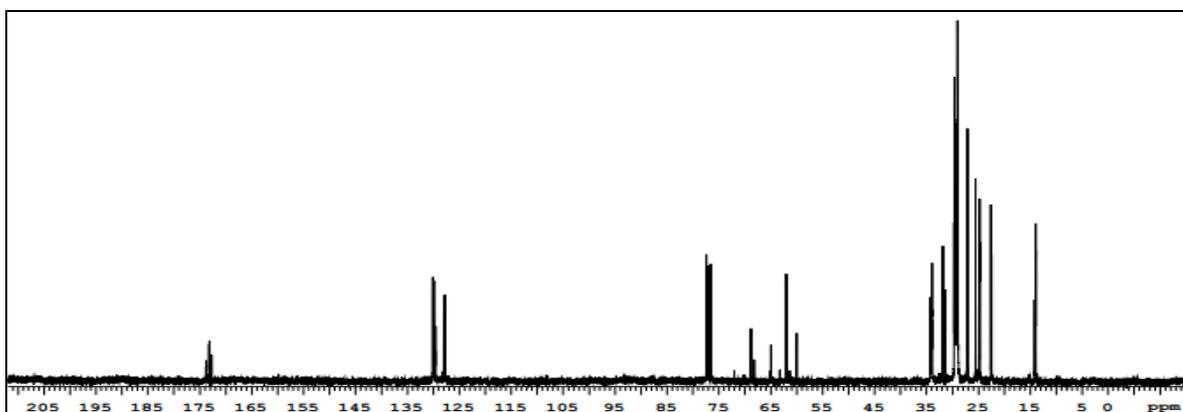
Figura 10: Cromatografia gasosa para separação da molécula do biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h



A caracterização de biossurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus* utilizando espectroscopia de RMN já foi descrita na literatura. Dessa forma, a composição do biossurfactante produzido pelo isolado B1 foi determinada por análise de RMN.

O RMN de ^{13}C (Figura 11) confirma resultados anteriores que mostram um pico característico de ésteres entre 170-180 ppm, picos de duplas ligações entre 125-130 ppm e carbonos alifáticos na região 10-40 ppm. O grupo éster presente nos resultados é provavelmente o resultado da modificação a partir de um ácido carboxílico no processo de esterificação utilizado na preparação da amostra. Faria et al. (2011) descreveram a análise por ^{13}C RMN e indicaram que a cauda lipídica do lipopeptídeo LSFM-05 está presente como uma mistura de três configurações diferentes, nomeadas normal, anteiso e isobranfrado, sendo as diferentes posições do CH_3 consistentes com mudanças químicas em 11,44; 14,15; 19,19 e 22 ppm, respectivamente. Dois picos semelhantes foram encontrados no presente estudo (Figura 11). Liu et al. (2009) também relataram uma mistura das formas normal, iso e anteiso na surfactina de *B. subtilis* HSO121. Pereira et al. (2011), descrevendo a caracterização de um biossurfactante a partir de três isolados distintos de *B. subtilis*, mostrou a presença de regiões distintas relativamente à molécula padrão, bem como entre os três extratos de biossurfactante estudados.

Figura 11: Espectro do ^{13}C NMR (CD_3OD , 300 MHz) do biossurfactante isolado de *Bacillus* sp. em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona.



O espectro de ^1H NMR (Figura 12) sugeriu a presença de hidrogênios em grupos metil entre 0-1,0 ppm, carbonos alifáticos na gama de 1,2-1,4 ppm e

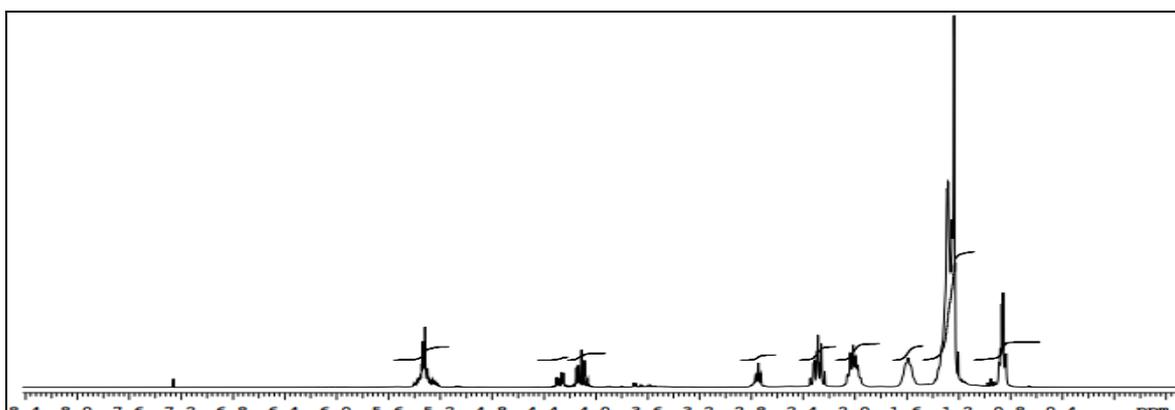
hidrogênios próximos da ligação dupla em 1,9-2,1 ppm, mais próximo do grupo carbonilo em 2,2 -2,4 ppm. O grupo amina foi encontrado em 2,7-2,8 ppm e os sinais entre 4,0-4,1 ppm foram devidos a hidrogênios junto ao grupo amina. Foi encontrado um éster numa região de 4,1-4,4 ppm e a presença de ligações duplas em 5,2-5,6 ppm. O sinal a 7,25 ppm foi atribuído ao sinal residual do solvente (clorofórmio).

Faria et al. (2011) mostraram uma caracterização estrutural da surfactina (C14 / Leu7) produzida por *B. subtilis* LSFM-05 crescido em glicerol bruto e detectaram na análise por ^1H NMR um grupo éster carbonilo a 5,2 ppm, indicando a presença de um anel de lactona na estrutura do biossurfactante. Uma região similar também foi identificada em nosso estudo (Figura 11).

Liu et al. (2009) também descreve a caracterização de um éster de surfactina-*o*-metil C15 produzido por uma cepa de lipopeptídeo de *B. subtilis* HSO 121. A relação integral das duas regiões diferentes de cadeias alifáticas (aproximadamente 1,55-1,25 ppm e 0,80-0,90 ppm) pode dar uma importante correlação entre a presença de *n*-surfactina e iso- ou/e anteiso-surfactinas (PEREIRA et al., 2011).

A presença de um pico intenso em torno de 5,3 ppm (Figura 12) observado no presente estudo corresponde provavelmente ao H-3 (próton terminal) da cadeia de ácidos graxos, o que também tem sido observado por outros autores (PEREIRA et al., 2011, LIU et al., 2009). Este resultado sugere que a biomolécula de tensioativo é um tipo de lipopeptídeo devido à presença de cadeia alifática e uma estrutura peptídica.

Figura 12: Espectro do ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) do biossurfactante isolado de *Bacillus* sp. em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona.



4.11 DISPERSÃO DE ÓLEO DO MOTOR

A capacidade de dispersão do óleo depende da diminuição da tensão interfacial da água-óleo devido ao biossurfactante (MORIKAWA et al., 2000). Como se vê na tabela 10, o biossurfactante bruto e isolado de *Bacillus* sp. exibiu capacidade de dispersar óleo, indicando uma elevada atividade superficial.

É importante destacar que o biossurfactante bruto possui em sua composição outros elementos provenientes do meio de cultivo e do metabolismo do micro-organismo que podem interferir nas atividades do biossurfactante bruto, algo que não acontece quando se utiliza o biossurfactante isolado (CMC ou 10 x CMC). A presença de outros elementos é a justificativa para o fato de o experimento com biossurfactante bruto feito neste trabalho apresentar diferença notória entre as duas proporções utilizadas como parâmetro (1:1 e 1:10).

Para aplicações ambientais, a utilização do biossurfactante na sua forma bruta é uma alternativa mais viável do ponto de vista econômico, uma vez que são necessários grandes volumes para estas aplicações. Em relação ao biossurfactante isolado, sua utilização na CMC foi suficiente para se obter resultados favoráveis.

Tabela 10: Capacidade de dispersar óleo motor pelo biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 48h (dados expressos como média \pm desvio padrão)

Biossurfactante/óleo	Dispersão de óleo (%)		
	Biossurfactante bruto	Biossurfactante (CMC)	Biossurfactante (10 x CMC)
1:1	86,0 \pm 0,3	76,0 \pm 0,3	81,5 \pm 0,6
1:10	55,0 \pm 0,5	80,0 \pm 0,5	88,0 \pm 0,5

4.12. BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DE MOTOR

Foram utilizados quatro cenários diferentes para avaliar a biodegradação do óleo de motor (Tabela 11). Os resultados foram registrados no dia 9 e 27 para

cada conjunto. Não ocorreu degradação no controlo da experiência (água do mar + óleo de motor). A adição do biossurfactante aumentou significativamente a biodegradação do óleo (cerca de 90%), como demonstrado no segundo e terceiro cenários da experiência. Além disso, a adição do biossurfactante na CMC foi suficiente para atingir a degradação máxima após 27 dias. Os resultados demonstram que o biossurfactante produzido é um intensificador eficiente para a degradação de compostos hidrofóbicos.

De acordo com Santos et al. (2016), podem ocorrer dois mecanismos de degradação. O primeiro envolve o aumento da biodisponibilidade do substrato hidrofóbico e o segundo envolve a interação entre o biossurfactante e a superfície celular, o que aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo que os substratos hidrofóbicos se combinem com as células bacterianas mais facilmente. De acordo com Zheng et al. (2012), a variação na taxa de biodegradação de um tensoativo específico depende de sua capacidade de solubilização, que é determinada pelas propriedades de suas micelas.

Tabela 11: Percentuais de biodegradação de óleo motor conduzidos em água do mar com e sem biossurfactante de *Bacillus* sp. cultivado em meio mineral suplementado com 2% de óleo residual de fritura e 0,12% de peptona por 27 dias (dados expressos como média \pm desvio padrão)

Condições	Dias	
	9	27
1: água do mar + óleo motor + bactéria	22 \pm 1,5	32 \pm 2,4
2: água do mar + óleo motor + bactéria + biossurfactante (CMC)	68 \pm 1,3	96 \pm 0,9
3: água do mar + óleo motor + bactéria + biossurfactante(2 x CMC)	74 \pm 1,6	97 \pm 0,6

Vários estudos descreveram a capacidade dos biossurfactantes bacterianos para aumentar a degradação de hidrocarbonetos. Estudando *Oceanobacillus* sp. BRI 10, Jadhav et al. (2013) relatam resultados semelhantes aos da presente investigação. Whang et al. (2008) usaram uma surfactina de *B. subtilis* ATCC 21332 e um ramnolípídeo de *P. aeruginosa* J4 para melhorar a degradação do diesel em água e solo contaminados em experimentos em escala de bancada. A surfactina, na CMC, aumentou a degradação do diesel (94%) em comparação com experimentos sem adição de surfactina (40%), enquanto a

adição de surfactina acima do CMC levou a uma redução da eficiência de biodegradação. Por outro lado, a adição do ramnolipídeo até 80 mg/L (CMC: 50 mg/L) aumentou a porcentagem de biodegradação a diesel. Num outro estudo, avaliou-se a capacidade de degradação do biodiesel de um biotensioativo de *B. amyloliquefaciens* An6 num meio líquido durante um período de 15 dias o que conduziu a um aumento de 15 a 30% na degradação dependendo da concentração (AYED et al., 2015).

Um biossurfactante de *B. subtilis* CN2 aumentou a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em óleo de motor mais de duas vezes ao longo de um período de 18 dias (BEZZA et al., 2015). A presença de um biossurfactante de *Bacillus* sp. em areia contaminada com óleo de motor aumentou a degradação do poluente em 10% (CHAPRÃO et al., 2015). Um biossurfactante de *P. cepacia* CCT6659 aumentou a degradação do petróleo bruto por células bacterianas para 83% em um período de 10 dias (SILVA et al., 2014a).

5 CONCLUSÕES

- Os micro-organismos presentes na água do mar apresentam potencial de produção de biossurfactantes.
- Resíduos industriais podem ser usados como substratos atrativos na produção de biossurfactantes.
- O estudo da variação das fontes de carbono e de nitrogênio, bem como do tempo de cultivo e da velocidade de rotação permitiram estabelecer as melhores condições de produção do biossurfactante, e o melhor isolado da bactéria do gênero *Bacillus*.
- A produção em biorreatores pode ser vantajosa, considerando o tipo de aplicação industrial da biomolécula.
- O biossurfactante produzido é um composto lipopeptídico aniônico com elevadas propriedades tensoativa, emulsificante e dispersante para óleos, com destaque para petroderivados, além de ser estável diante das condições de salinidade, pH e temperatura estudadas, podendo ser usado para auxiliar na biodegradação de hidrocarbonetos em ambiente marinho.
- A biomolécula apresenta estrutura e propriedades de tensão interfacial e superficial compatíveis com valores descritos na literatura para surfactantes produzidos por espécies de *Bacillus*, contudo com eficiência menor que a da surfactina de *B. subtilis* descrita na literatura.
- O biossurfactante produzido tem perspectivas de: aumento de escala e remoção de petroderivados em ambiente marinho.

REFERÊNCIAS

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

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAFI, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 289–303. 2008.

AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Minireview Microbial Surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, p. 99-105. 2007.

ALATOOM, A.A.; CUNNINGHAM, S.A.; IHDE, S.M.; MANDREKAR, J.; PATEL, R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2868-73. 2011.

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

ALMEIDA, C.M.R.; DIAS, A.C.; MUCHA, A.P.; BORDALO, A.A.; VASCONCELOS, M.T.S.D. Influence of surfactants on the Cu phytoremediation potential of a saltmarsh plant. **Chemosphere**, v. 75, p. 135–140. 2009.

ALMEIDA, D.G., SOARES DA SILVA, R.C.F., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SANTOS, V.A., BANAT, I.M., SARUBBO, L.A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1718. 2016.

ALVAREZ, V.M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES J.M., SOUZA, P.M.; ARAÚJO, L.V.; BARROS, T.G.; SOUZA, R.O.M.A.; FREIRE, D.M.G.; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.136, p.14–21, 2015.

AL-WAHAIBI, Y., JOSHI, S., AL-BAHRY, S., ELSHAFIE, A., AL-BEMANI, A. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.114, p. 324-333. 2013.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; HEDGE, S. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* ssp. on biodegradation of crude oil. In: **International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering**,

Proceedings of the 2nd International Proceedings of Chemical. Singapura: IACSIT Press, v. 6, p. 71–75. 2011.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 31, p 488-494. 1968.

ARNESEN, L.P.S., FOGERLUND, A., GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 579–606. 2008.

ASÇI, Y.; NURBAS, M.; AÇIKEL, Y. A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v.154, p. 663–673. 2008.

ASIMIEA, O.A.; SAM-WOBO, S.O. The impact of hydrocarbon waste from brass oil terminal on the Phytoplankton and Periphyton communities of lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v. 2, p. 729–733. 2011.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 178–182. 1995.

AYED, H.B.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUNDH, A.; HMIDET, N.; NASRI, M. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 99, p. 8-14. 2015.

BACHMANN, R.T.; JOHNSON, A.C.; EDYEAN, R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: an overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 225–237. 2014.

BAI, G.; BRUSSEAU, M.L.; MILLER, R.M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 25, p. 157–170. 1997.

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

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications. **Aplicacion of Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 427–444. 2010.

BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K.; CAMEOTRA, S.S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 697. 2014.

BAO, M.T., WANG, L.N., SUN, P.Y., CAO, L.X., ZHOU, J., LI, Y.M. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 1117–1185. 2012.

BARROS, F.F.C., PONEZI, A.N., PASTORE, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1071–8. 2008

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, M.G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, n. 2, v. 30, p. 01-14. 2007.

BAYOUMI, R.A., HAROUN, B.M., GHAZAL, E.A., MAHE, Y.A. Structural analysis and characterization of biosurfactants produced by some crude oil utilizing bacterial strains. **Australian Journal of Basic and Applied Science**, v. 4, p. 3484, 2010.

BEZZA, F.A., CHIRWA, E.M.N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v.101, p.168–178. 2015.

BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S.S.; CHOPRA, H.K. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 160. 2013.

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

BORDOLOI, N.K.; KONWAR, B.K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v.170, p. 495–505. 2009.

BORODOLI, N.; KONWAR, B. Microbial surfactant enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 63, p. 73-82. 2008.

BOTTONE, E.J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 23, v. 2, 382–398. 2010.

CAMPOS, J.M.; STAMFORD, T.L.M.; SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 1097–1108. 2013.

CARRILLO, P.G., MARDARAZ, C., PITTA-ALVAREZ, S.J., GIULIETTI, A.M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 12, p. 82 – 84. 1996.

CETESB - Derrames de óleo no mar e os ecossistemas costeiros. São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/cursos/cursos.asp>>. Accessed in 01 July 2016.

CHAKRABORTY, J.; DAS, S. Biosurfactant-based bioremediation of toxic metals. **In: DAS, S. (Org.) Microbial Biodegradation and Bioremediation**. Rourkela Odisha: Elsevier, v. 1, p. 167–201. 2014.

CHERKAOUI, A.; HIBBS J., EMONET, S.; TANGOMO, M., GIRARD, M.; FRANCOIS, P.; SCHRENZEL, J. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1169-75. 2010.

CHAPRÃO, M.J.; FERREIRA, I.N.S.; CORREA, P.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SILVA, E.J.; SARUBBO, L.A. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, p. 471–479. 2015.

CHEN, Y-C.; CHIANG, T-J.; LIANG, T-W.; WANG, I-L.; WANG, S.-L. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 62–69. 2012.

CLAYDON, M.A.; DAVEY, S.N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D.B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature**, v. 14. 1996.

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

COSTA, A.S.; ROMÃO, L.P.; ARAÚJO, B.R.; LUCAS, S.C.; MACIEL, S.T.; WISNIEWSKI, A., JR.; ALEXANDRE, M.R. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 31–39. 2012.

DASTGHEIB, S.M.M., AMOOZEGAR, M.A., ELAHI, E., ASAD, S., BANAT, I.M., Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 263–270. 2008.

DEEPIKA, K.V., KALAM, S., SRIDHAR, P.R., PODILE, A.R., BRAMHACHARI, P.V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 38-47. 2016.

DEEPIKA, K.V., NAGARAJU, G.P.; BRAMHACHARI, P.V. Optimization of Cultural Conditions for Marine Microbial Biosurfactant Production: Future Prospects from

Untapped Marine Resources. **Marine Pollution and Microbial Remediation**, p. 105-128. 2017.

DELEU, M., RAZAFINDRALAMBO, H., POPINEAU, Y., JACQUES, P., THONART, P., PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 3–10. 1999.

DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64. 1997.
EL-SHESHTAWY, H.S.; AIAD, I.; OSMAN, M.E.; ABO-ELNASR, A.A., KOBISY, A.S. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. **Egyptian Journal of Petroelum**, v. 25, p. 293–298. 2016.

FARIA, A.F.; TEODORO-MARTINEZ, D.S.; BARBOSA, G.N.O.; VAZ, B.G.; SILVA, I.S.; GARCIA J.S.; TÓTOLAC, M.R.; EBERLINB, M.N.; GROSSMAND, M.; ALVES, O.L.; DURRANT, L.R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1951–1957. 2011.

FERNANDES, P.L.; RODRIGUES, E.M.; PAIVA, F.R.; AYUPE, B.A.L.; MCINERNEY, M.J.; TÓTOLA, M.R. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel*, v. 180, p. 551–557. 2016.

FRANZETTI, A.; CAREDDA, P.; RUGGERI, C.; LA COLLA, P.; TAMBURINI, E.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v. 75, p. 810–807. 2009.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase I. Isolation of bacteria secreting potent amylase and their distribution. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v.19, p. 487–503. 1943a.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. II. Bacterial and physiological nature. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 19, p. 643–650. 1943b.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: a review. **Journal of Oil and Science**, v. 55, p. 155-166. 2006.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; BOGAERT, I.V. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 66–72. 2014.

GHOJAVAND, H., ALMEIDAAHABZADEH, F., ROAYAEI, E., SHAHRAKAI, A., Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the

Bacillus subtilis group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 172-176. 2008.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of Bacillus subtilis lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. **Biotechnology Research International**. 2011.

GREENWOOD, P.F.; WIBROW, S.; GEORGE, S.J.; TIBBETT, M. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. **Organic Geochemistry Journal**, v. 40, p. 293–300. 2009.

GUDINA, E., TEIXEIRA, J., RODRIGUES, L. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by Lactobacillus paracasei. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 298-304. 2010.

GUDIÑA, E.J., FERNANDES, E.C., RODRIGUES, A.I., TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, L.R., Biosurfactant production by Bacillus subtilis using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 59. 2015.

GUDIÑA, E.J., PEREIRA, J.F.B., RODRIGUES, L.R., COUTINHO, J.A.P., TEIXEIRA, J.A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 68, p. 56–64. 2012.

GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.B.; COSTA, R.; COUTINHO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactant-producing and oil-degrading Bacillus subtilis strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 106– 113. 2013.

HAFFNER, D.; SCHECTER, A. Persistent organic pollutants (POPs): a primer for practicing clinicians. **Current Environmental Health Reports**, v.1, p. 123–131. 2014.

HARWOOD, C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v.10, p. 247–256. 1992.

HASHIM, M.A.; MUKHOPADHYAY, S.; SAHU, J.N.; SENGUPTA, B. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 2355–2388. 2011.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Biosurfactant-assisted bioaugmentation in bioremediation. In: SATYANARAYANA, T.; JOHRI, B.N.; PRAKASH, A. (Org.) Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment. New York: **Springer**, v. 1, p. 631–664. 2012.

HERMAN, D.C.; ARTIOLA, J.F.; MILLER, R.M. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 2280–2285. 1995.

IBRAHIM, M.L.; IJAH, U.J.J.; MANGA, S.B.; BILBIS, L.S.; UMAR, S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 28-34, 2013.

ISHIKAWA, K.; NIWA, Y.; HATAKEDA, K.; GOTOH, T. Computer-aided peptide sequencing of an unknown cyclic peptide from *Bacillus subtilis*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 23, p. 290–291. 1988.

ISMAIL, W.; AL-ROWAIHI, I.S.; AL-HUMAM, A.A.; HAMZA, R.Y.; EL NAYAL, A.M.; BOUOUDINA, M., Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 168–178. 2013.

IVSHINA, I.B.; KUYUKINA, M.S.; KRIVORUCHKO, A.V.; ELKIN, A.A.; MAKAROV, S.O.; CUNNINGHAM, C.J.; PESHKUR, T.A.; ATLAS, R.M.; PHILP, J.C. Oil spill problems and sustainable response strategies through new Technologies. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 17, p. 1201. 2015.

JADHAV, V.V.; YADAV, A.; SHOUCHE Y.S.; APHALE, S., MOGHE, A.; PILLAI, S.; ARORA, A.; BHADDEKA, R.K. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. **Desalination**, v. 318, p. 64–71. 2013.

JENSEN, G.B., HANSEN, B.M., ELLENBERG, J., MAHILLON, J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 631– 640. 2003.

JOSHI, S.J.; GEETHA, S.J.; DESAI, A.J. Characterization and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* R2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, p. 346-61. 2015.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A.J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4603-4608b. 2008b.

JOSHI, S.J.; BHARUCHA, C., JHA S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*. 99, 95-199. 2008a

KAPADIA, S.G.; YAGNIK, B.N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 4, p. 1– 8. 2013.

KAVITHA, V.; MANDAL, A.B.; GNANAMANI, A. Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: An approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 94, p. 24–30. 2014.

KESKIN, N.O.S.; HAN, D.; OZKAN, A.D.; ANGUN, P.; UMU, O.C.O.; TEKINAY, T. Production and structural characterization of biosurfactant produced by newly

isolated *staphylococcus xylosus* STF1 from petroleum contaminated soil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 133, p. 689–694. 2015.

KHONDEE, N.; TATHONGA, S.; PINYAKONG, O.; MÜLLER, R.; SOONGLERDSONGPHA, S.; RUANGCHAINIKOM, C.; TONGCUMPOU, C.; LUEPROMCHAI, E. Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 47–54. 2015.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; MAKAROV, S.O.; LITVINENKO, L.V.; CUNNINGHAM, C.J.; PHILIP, J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environment International**, v. 31, p. 155–161. 2005.

LAHA, S., LIU, Z., EDWARDS, D.A., LUTHY, R.G. Surfactant solubilization of phenanthrene in soil–aqueous systems and its effects on bioremediation. **Advances in Chemistry Series**, v. 244, p. 339–361. 1995.

ŁAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 2327–2339. 2013.

LEBRERO, R.; ESTRADA, J.M.; MUÑOZ, R.; QUIJANO, G. Toluene mass transfer characterization in a biotrickling filter. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 60, p. 44–49. 2012.

LI, J.; DENG, M.; WANG, Y.; CHEN, W. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycolides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 112, p. 72–79. 2016.

LIN, C.W.; CHEN, L.H.; YET-POLE, I.; LAI, C.Y. Microbial communities and biodegradation in lab-scale BTEX-contaminated groundwater remediation using an oxygen-releasing reactive barrier. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 33, p. 383–391. 2010.

LIN, M.; YUHUA, L.; WEIWEI, C.; HUI, W.; XIAOKE, H. Use of bacteria-immobilized cotton fiber to absorb and degrade crude oil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 8–12. 2014.

LIN, S. C.; LIN, K. G.; LO, C. C.; LIN, Y. M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 267–273. 1998.

LIN, S.C., SHARMA, M.M., GEORGIU, G., Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 138–145. 1993.

LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANGA, H.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 31–37. 2015.

LIU, X.; REN, B.; CHEN, M.; WANG, H.; KOKARE, C.R.; ZHOU, X.; WANG, J.; DAI, H.; SONG, F.; LIU, M.; WANG, J.; WANG, S.; ZHANG, L. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H. **Applied microbial and cell physiology**, v. 87, p. 1881–1893. 2010.

LIU, X-Y., YANG, S-Z., MU, B-Z., Production and characterization of a C15-surfactin-Omethyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. **Process Biochemistry**, v. 11, p. 44–51. 2009.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology Braz**, v. 52, p. 785 – 793. 2009.

MACIEL-SOUZA, M.C.; MACRAE, A.; VOLPON, A.G.T.; FERREIRA, P.S.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Chemical and microbiological characterization of mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara Bay. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 262–266. 2006.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.C., Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 37–42. 1997a.

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

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Application of Microbiology Biotechnology**, v. 1, p. 1–19, 2011.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **The Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435. 2015.

MARCHANT, R., BANAT, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1597–1605. 2012a.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnology**, v. 11, p. 558–565. 2012b.

MARCHANT, R.; FUNSTON, S.; UZOIGWE, C.; RAHMAN, P.K.S.M.; BANAT, I.M. Production of biosurfactants from nonpathogenic bacteria. In: Kosaric, N.; Sukan, F. Biosurfactants: production and utilization - processes, technologies and economics. **CRC Press**, p. 73-81. 2014.

MEARNS, A.J. Cleaning oiled shores: putting bioremediation to the test. **Oil Spill Science and Technology**, v. 4, p. 209–217. 1997.

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

MIRANDA, L.S., MOREIRA, I.T.A., OLIVEIRA, O.M.C., SANTOS, C.P., PINHEIRO, S.M.M., OLIVEIRA, L.M.L., MARTINS, A.B.O., FILHO, M.S.C. Oil-suspended particulate material aggregates as a tool in preventing potential ecotoxicological impacts in the São Paulo river, Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil: Influence of salinity and suspended particulate material. **Marine Pollution Bulletin**, v. 112, p. 91-97. 2016.

MORIKAWA, M., HIRATA, Y., IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of the lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211-218. 2000.

MORRIS, B.F.; LOUGHLIN, T.R. Overview of the Exxon Valdez Oil Spill, 1989-1992. In: LOUGHLIN, T.R. (Org.). **Marine Mammals and the Exxon Valdez**. Seattle: Academic Press, cap. 1, p. 1-22. 1994.

MOUAFI, F.E.; ELSOUDA, M.M.A.; MOHARAMB, M.E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 31-37. 2016.

MULLIGAN, C.N., Environmental applications for biosurfactants, **Environmental Pollution**, p.183-198. 2005.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 3016-3019. 1989.

MULLIGAN, C.N.; WANG, S. Remediation of a heavy metal contaminated soil by a rhamnolipid foam. **Engineering Geology**, v. 85, p. 75-81. 2006.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 3812-3820. 1999.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M., Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 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**, v. 97, p. 336-341. 2006.

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

OCHOA-LOZA, F.J.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 479-485. 2001.

OCHOA-LOZA, F.J.; NOORDMAN, W.H.; JANNSEN, D.B.; BRUSSEAU, M.L.; MAIER, R.M. Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. **Chemosphere**, v. 66, p. 1634–1642. 2007.

OLIVEIRA, D.W.F., SOUSA, J.R., FRANÇA, I.W.L., FELIX, A.K.N., MARTINS, J.J.L., GONÇALVES, L.R.B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34–43. 2013.

OLOKE, J.K., GLICK, B.R. Production of bioemulsifier by an unusual isolate of salmon/red melanin containing *Rhodotorula glutinis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 164–171. 2005.

OVES, M.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 121–129. 2013.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-654. 2011.

PAMPLONA, N. **Ibama investiga mancha de 22 km² encontrada na bacia de Campos**. Folha de S. Paulo, São Paulo, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2016/02/1735745-ibama-investiga-mancha-de-22-km-encontrada-na-bacia-de-campos.shtml>>. Acesso em: 05 abr. 2016.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v.111, p. 259–268. 2013.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J.-M., LABBE, H., GRANGEMARD, I., DAS, B.C., PTAK, M., WALLACH, J., MICHEL, G. [Ala4]Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. **European Journal of Biochemistry**, v. 224, p. 89–96. 1994.

PEZESHKI, S.R.; DELAUNE, R.D. United States Gulf of Mexico coastal marsh vegetation responses and sensitivities to oil spill: A Review. **Environments**, v. 2, p. 586-607. 2015.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery, **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p.172– 2008.

PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 711–753. 1977.

PRINCE, R.C.; LESSARD, R.R.; CLARK, J.R. Bioremediation of marine oil spills Oil. **Gas Science and Technology**, v. 58, p. 463–468. 2003.

RADWAN, S.S., AL-HASAN, R.H., ALI, N., SALAMAH, S., KHANAFER, M., Oil-consuming microbial consortia floating in the Arabian Gulf. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 56, p. 28–33. 2005.

RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J.; THAYUMANAVAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25–32. 2002.

RAHMAN, M.S.; ANO, T.; SHODA, M. Second stage production of iturin a by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 513–515. 2006.

RAMÍREZ, I.M.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E.J.; ROMÁN, M.G.; BANAT, I.M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. **Bioresource technology**, v.198, p. 231–236. 2015.

RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. S. Role of Biopolymers in Industries: Their Prospective Future Applications. **Environment and Sustainable Development**, p. 133-142. 2014.

REIS, F.A.S.L.; SÉRVULO, E.F.C.; DE FRANCA, F.P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113–116, p. 899–912. 2004.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; VANDER MEI, H.C.; OLIVEIRA, R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 49, p. 79-86. 2006.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249–252. 2002.

ROONEY, A.P.; PRICE, N.P.J.; EHRHARDT, C.; SWEZEY, J.L.; BANNAN, J.D. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. *nov.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2429–2436. 2009.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; BARROS-NETO, B.; CAMPOS-TAKAKI, J.G.M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 907-914. 2008.

RUFINO, R.D; LUNA, J.M., SARUBBO, L.A; RODRIGUES, L.R.M; TEIXEIRA, J.A.C; CAMPOS-TAKAKI, G.M.J. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a

biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p 1 – 5. 2011.

RUIZ-GARCÍA, C.; BEJAR, V.; MARTINEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 191–195. 2005.

SANTA ANNA, I.M.; SEBASTIAN, G.V.; PEREIRA, N., JR.; ALVES, T.L.M.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91, p. 459–467. 2002.

SANTOS, D.K.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SALGUEIRO, A.A.; SARUBBO, L.A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43–50. 2013.

SANTOS, D.K.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 401. 2016.

SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 400–406. 2006.

SARUBBO, L.A.; ROCHA JR, R.B.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n.8, p. 707–723. 2015.

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G.; CHOPADEV, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 436–450. 2010.

SCHRAMM, L.L. Surfactants: Fundamentals and Applications in The Petroleum Industry. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 650p. 2000.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical application. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, p. 123-133. 2008.

SHAVANDI, M.; MOHEBALI, G.; HADDADI, A.; SHAKARAMI, H.; NUHI, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.82, p.477–482. 2011.

SILVA, E.J., ROCHA E SILVA, N.M.P., RUFINO, R.D., LUNA, J.M. , SILVA, R.O., SARUBBO, L.A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 36–41. 2014.

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

SILVA, R.C.F.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; FARIAS, C.B.B.; FILHO, H.J.B.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using Response Surface Methodology. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 50, p. 137–142. 2013.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B., RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79(1), p. 174-83. 2010.

SINGH, A.; VAN HAMME J.D.; WARD O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects Biotechnology**, v. 25, p. 99–121, 2007.

SKWOR, T., SHINKO, J., AUGUSTYNIAK, A., GEE, C., ANDRASO, G. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* Isolates from lake Erie. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 80, v.3, p. 841-8. 2014.

SOBRINHO, H.B.S.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; PORTO, A.L.F.; SARUBBO, L.A. **Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications.** Recent Developments in Biotechnology, 1st ed.; Houston: Studium Press LLC, v 11, p. 1–29. 2013a.

SOBRINHO, H.B.S.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; PORTO, A.L.F.; SARUBBO, L.A. Application of Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 in Removal of Petroleum Derivative from Soil and Sea Water. **Journal of Life Sciences**, v. 7, p. 559-569. 2013b.

SOUSA, M., MELO, V.M.M., RODRIGUES, S., SANT'ANA, H.B., GONÇALVES, L.R.B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 897–906. 2012.

SOUZA, E.C.; VESSONI-PENNA, T.C.; OLIVEIRA, R.P.S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 88-94. 2014.

SRINIVASAN, R.; KARAOZ, U.; VOLEGOVA, M.; MACKICHAN, J.; KATO-MAEDA, M.; MILLER, S.; NADARAJAN, R.; BRODIE, E.J.; LYNCH, S.V. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. **PloS ONE**, v. 10, p. 2. 2015.

SUMMERS, D. **Enhancing Oil Recovery: A Look at Stripper Wells**. Oil price, 20 mai. 2011. Disponível em: <<http://oilprice.com/Energy/Crude-Oil/Enhancing-Oil-Recovery-A-Look-At-Stripper-Wells.html>>. Acesso em: 16 jul. 2016.

SWARNKAR, V.; AGRAWAL, N.; TOMAR, R. Sorption of chromate and arsenate by surfactant modified erionite (E-SMZ). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 33, p. 919–927. 2012.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 40C, p. 61–67. 1985.

TANSEL, B.; LEE, M.; BERBAKOV, J.; TANSEL, D. Z.; KOKLONIS, U. Dispersion of Louisiana crude oil in salt water environment by Corexit 9500A in the presence of natural coastal materials. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 143, 58–64. 2014.

TAVAKOLY SANY, S. B.; HASHIM, R.; REZAYI, M.; SALLEH, A.; RAHMAN, M. A.; SAFARI, O.; SASEKUMAR, A. Human health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons from consumption of blood cockle and exposure to contaminated sediments and water along the Klang Strait, Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, p. 268–279. 2014.

TEHRANI, G. M.; TAVAKOLY SANY, S. B.; HASHIM, R.; SALLEH, A. Predictive environmental impact assessment of total petroleum hydrocarbons in petrochemical wastewater effluent and surface sediment. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, p. 177. 2016.

VECINO, X.; BARBOSA-PEREIRA, L.; DEVESA-REY R.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Optimization of liquid–liquid extraction of biosurfactants from corn steep liquor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1629–1637. 2015.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, p. 181–192, 2015.

WANG, L.T., LEE, F.L., TAI, C.J., KUO, H.P. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 671–675. 2008.

WANGA, T.; SUNA, H.; MAOB, H., ZHANGA, Y.; WANGA, C.; ZHANGA, Z.; WANGA, B.; SUNA, L. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by NovoGro biostimulation and changes of soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 483–490. 2014.

WEN, J.; STACEY, S.P.; MCLAUGHLIN, M.J.; KIRBY, J.K. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 2214–2221. 2009.

WHANG, L.M.; LIU, P.W.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of dieselcontaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 155–163. 2008.

WINTERBURN, J.B.; RUSSELL, A.B.; MARTIN, P.J. **Integrated recirculating foam fractionation for the continuous recovery of biosurfactant from fermenters**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, p. 132–139. 2011.

YEUNG, C.W.; LAW, B.A.; MILLIGAN, T.G.; LEE, K.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and sediments from an offshore oil and gas production platform. **Marine Pollution Bull**, v. 62, p. 2095–2105. 2011.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D. R.; MCINERNEY, M. J.; DUNCAN, K. E. In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus strains* correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 127-132. 2013.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347. 2004.

ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactante. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3276–3282. 1992.

ZHAO, J.; LI, Y.; ZHANG, C.; YAO, Z.; ZHANG, L.; BIE, X.; LU, F.; LU, Z. Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 889-896. 2012.

ZHENG, C.; WANG, M.; WANG, Y.; HUANG, Z. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 338–42. 2012.