

Universidade de Passo Fundo
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Infraestrutura e Meio Ambiente

Andressa Decesaro

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS PARA
APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Passo Fundo

2016

Andressa Decesaro

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS PARA
APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla e coorientação do Prof. Dr. Antônio Thomé.

Passo Fundo

2016

Andressa Decesaro

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS PARA
APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data de aprovação: 11 de abril de 2016.

Doutora Luciane Maria Colla
Orientadora

Doutor Antônio Thomé
Coorientador

Doutor Vandrê Barbosa Brião
Universidade de Passo Fundo – UPF

Doutora Ana Cláudia Margarites
Universidade de Passo Fundo – UPF

Doutora Fátima Menezes Bento
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Passo Fundo

2016

*A minha família e ao Cristiano.
Por acreditarem que era possível e pelo apoio de todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida renovado em cada amanhecer. A Jesus por me guiar e a Maria por sua presença suave e serena.

Aos meus pais, Armando e Marlene, pelo amor zeloso, paciência e perseverança de estar sempre junto, apoiando e incentivando.

Aos meus irmãos, Diana e Felipe, e meu cunhado Moacir, pelos abraços, sorrisos, beijos fraternais e amizade sincera.

A minha amiga e cunhada Débora pela amizade, companhia e ajuda de todos os dias.

Ao meu namorado Cristiano pelo carinho dedicado a mim. Obrigada pelo companheirismo, lealdade, compreensão e amor durante o mestrado. Pela ajuda, ombro amigo nos momentos difíceis. Posso confessar, que minha vida é muito mais feliz em sua companhia. Você possui todas as qualidades de um grande homem e por isso tudo você é o meu amor.

Aos meus, super ajudantes de todas as horas, Ângela, Thaís e Alan, pelas noites incansáveis no laboratório, pela ajuda, amizade e companheirismo. Sem vocês não teria conseguido.

À Professora Doutora Luciane Maria Colla, por ter me acompanhado durante todo o processo de formação do mestrado, pela sua amizade, consideração e conselhos valiosos. Obrigada pela paciência, compreensão nos momentos turbulentos e confiança depositada em meu trabalho, minha eterna admiração. Ao Professor Doutor Antônio Thomé que colaborou, sempre que necessário, meu muito obrigado.

Às amigas e colegas, Ritielli, Natália, Vanessa, Aline, Janaína, Cristiane e ao amigo Francisco, obrigada pelo apoio, aprendizado e momentos de alegria, espero nunca perder os laços de amizade e que eles apenas se revigorem.

À Universidade de Passo Fundo que me ofereceu estrutura para o trabalho científico, professores e funcionários qualificados, ambiente propício ao aprendizado e me possibilitou fazer muitos amigos.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

*“Há os que se queixam do vento.
Os que esperam que ele mude.
E os que procuram ajustar as velas.”*

William G. Ward

RESUMO

A produção de biossurfactantes a partir de meios de cultivo contendo resíduos agroindustriais tem sido foco de vários estudos, dada à necessidade de redução do custo de produção destes biocompostos. A aplicação dos biossurfactantes ocorre em inúmeros setores industriais, e também em processos de biorremediação, onde o composto permite a dessorção e consequente emulsão do contaminante, facilitando, assim, a assimilação pelos microrganismos autóctones, culminando na remediação do solo contaminado. O objetivo deste estudo foi produzir biossurfactantes e utilizar estes biocompostos em processo de biorremediação *ex situ* de solo contaminado com biodiesel. Os biossurfactantes foram produzidos pelas bactérias *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*, previamente isoladas de solo contaminado com óleo diesel. A produção de biossurfactantes foi realizada utilizando fermentação submersa em meio de cultivo compostos por soro de leite ou permeado da ultrafiltração de soro de leite, suplementados por fontes de nitrogênio, micronutrientes e indutores. Posteriormente, o biossurfactante obtido a partir dos meios de fermentação foi utilizado em um planejamento experimental com o objetivo de avaliar a influência da adição de biossurfactantes na biorremediação de solo contaminado com biodiesel. Os biossurfactantes produzidos mostraram-se adequados para a diminuição da tensão superficial, sendo que o menor valor de tensão superficial obtido foi para o tratamento com adição de sulfato de amônio, na concentração de 1,0%, com micronutrientes e como indutor óleo de soja, na concentração de 2,0%, para ambos os microrganismos. A tensão superficial mínima, para fermentação com soro de leite, foi obtida com *Bacillus methylotrophicus* (27,51 mN/m) e na fermentação realizada utilizando o permeado de soro de leite a partir de ultrafiltração a tensão superficial foi de 26,02 mN/m, usando o *Bacillus pumilus*. Ambos os microrganismos apresentaram estabilidade de comportamento, pois na repetição do tratamento com maior redução da tensão superficial obtiveram-se resultados muito próximos aos alcançados na execução do planejamento. Os biossurfactantes produzidos demonstraram potencial para aplicação em biorremediação de solo contaminado com biodiesel, sendo que a remoção máxima, em torno de 57%, foi obtida nos ensaios realizados com biossurfactante adicionados na concentração de 0,5% e 1,0% em solo não esterilizado, após 90 d de ensaio. Com relação aos tratamentos com o solo estéril, a remoção do contaminante ficou em torno de 20%, indicando que o percentual de biossurfactante não influenciou. Esse percentual ocorre devido à adesão do contaminante na matriz do solo, não sendo possível a remoção pelos métodos e solventes utilizados. A liberação de CO₂, apresentou valores elevados de carbono acumulado nos ensaios adicionados de biossurfactante, sendo o valor máximo de 6.474,41 mg C-CO₂/kg de solo, com adição de 0,5% de biossurfactante. Desse modo, verificou-se que o uso de biossurfactantes nas concentrações de 0,1% a 1,0% auxiliaram na remoção do biodiesel em solo, sem influência nos processos físico-químicos do contaminante no solo.

Palavras-chave: soro de leite, *Bacillus* sp., bioestimulação, surfactina.

ABSTRACT

The production of biosurfactants using agroindustrial wastes has been the focus of several studies, given the need to reduce the cost of production of these biocompounds. Biosurfactants can be applied in numerous industrial sectors, and in bioremediation processes, wherein the compound permits desorption and the resulting contaminant emulsion, thereby facilitating the assimilation by the indigenous microorganisms, resulting in the remediation of the contaminated soil. The aim of this study was to produce biosurfactants and use these biocompounds in bioremediation of ex situ soil contaminated with biodiesel. The biosurfactants were produced by bacteria *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus pumilus*, previously isolated from soil contaminated with diesel oil. The production of biosurfactants was accomplished using submerged fermentation in a culture media added by whey or permeate of whey ultrafiltration, supplemented with nitrogen sources, micronutrients and inducers. After, biosurfactants was obtained from the fermentation media and used in an experimental design with the aim of evaluate the influence of the addition of biosurfactants in the bioremediation of a soil contaminated with biodiesel. The biosurfactant produced proved suitable for the reduction of surface tension, with the lowest surface tension value obtained in the media prepared with addition of ammonium sulfate at a concentration of 1.0% with micronutrients and soybean oil as an inducer at a concentration of 2.0% for both microorganisms. The minimal superficial tension, to fermentation with whey, was obtained with *Bacillus methylotrophicus* (27.51 mN/m) and in the fermentation realized using the permeate from ultrafiltration whey the superficial tension was 26.02 mN/m using the *Bacillus pumilus*). Both microorganisms showed behavioral stability, because the re-treatment with further reduction of tension superficial yielded very similar results to those achieved in the implementation of the experimental desing. The biosurfactant produced showed potential for use in bioremediation of soil contaminated with biodiesel, wherein the maximum removal of about 57% was obtained in assays performed with biosurfactant added at a concentration of 0.5% and 1.0% in soil does not sterilized after 90 d test. Regarding treatments with sterile soil, the removal of the contaminant was around 20%, indicating that the percentage of biosurfactant not influenced. This percentage is due to the contaminant adhesion in the soil matrix, it is not possible removal by methods and solvents. The release of CO₂, showed high levels of carbon accumulated in the tests added biosurfactant, the maximum value of 6474.41 mg C-CO₂/kg soil, with 0.5% of biosurfactant. Thus, it was found that the use of biosurfactants in concentrations of 0.1% to 1.0% assisted in the removal of soil biodiesel without influence on the physico-chemical processes of the contaminant in the soil.

Keywords: whey, *Bacillus* sp, biostimulation, surfactin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da metodologia experimental.	33
Figura 2 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra do Microrganismo 1 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.	45
Figura 3 – Sequência parcial do RNA ribossomal 16S da amostra analisada.	45
Figura 4 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra do Microrganismo 2 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.	46
Figura 5 – Sequência parcial do RNA ribossomal 16S da amostra analisada.	46
Figura 6 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> , a partir de soro de leite.	48
Figura 7 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> , a partir de soro de leite. ...	49
Figura 8 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus pumilus</i> , a partir de soro de leite.	50
Figura 9 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus pumilus</i> , a partir de soro de leite.	51
Figura 10 – Efeito do tipo da fonte de nitrogênio (a) e do tipo de indutor (b) na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> , a partir de soro de leite.	54
Figura 11 - Efeito da fonte de nitrogênio (a), da concentração da fonte de nitrogênio (b), da adição da solução de micronutrientes (c), do tipo de indutor (d) e da concentração de indutor (e) na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus pumilus</i> , a partir de soro de leite.	55
Figura 12 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> , a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.	57
Figura 13 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> , a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.	58
Figura 14 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus pumilus</i> , a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.	59
Figura 15 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus pumilus</i> , a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.	60
Figura 16 – Efeito do tipo de indutor na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> , a partir do permeado de ultrafiltração de soro de leite.	63
Figura 17 – Efeito da adição da solução de micronutrientes (a) e do tipo de indutor (b) na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com <i>Bacillus pumilus</i> , a partir do permeado de ultrafiltração de soro de leite.	64
Figura 18 – Variação da tensão superficial (a) e da concentração de biomassa (b) no decorrer dos 5 d de fermentação, para o tratamento 4 (T4)*.	65
Figura 19 – Relação entre a tensão superficial e a concentração de biomassa para <i>Bacillus methylotrophicus</i> (a) e <i>Bacillus pumilus</i> (b).	66

Figura 20 – Atividades emulsificantes O/A (a) e A/O (b) para ambos os microrganismos.....	67
Figura 21 - Espectro de MALDI-MS de biossurfactantes produzidos por <i>Bacillus methylotrophicus</i> com a detecção dos íons que caracterização as isoformas de lipopeptídios.....	71
Figura 22 - Esquema da estrutura primaria de uma surfactina.....	71
Figura 23: Espectro de MALDI-MS com ampliação da região de <i>m/z</i> 1000 a 1140 caracterizando as isoformas da surfactina proveniente da bactéria <i>Bacillus methylotrophicus</i>	71
Figura 24 – Liberação de CO ₂ ao longo dos 90 dias de experimento.....	73
Figura 25 – Liberação de CO ₂ total em função da técnica de biorremediação.....	74
Figura 26 – Remoção do contaminante em 90 d de experimento.....	76
Figura 27 – Remoção de biodiesel em solo esterilizado e não esterilizado.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento Fatorial Fracionário 2 ⁵⁻¹ utilizado para avaliação das variáveis significativas sobre a produção de biossurfactantes.	36
Tabela 2 – Caracterização geotécnica e física do solo utilizado.	38
Tabela 3 – Planejamento Experimental dos ensaios de biorremediação.	39
Tabela 4 – Caracterização do soro de leite e do permeado da ultrafiltração do soro de leite. .	44
Tabela 5 – Relação entre a tensão superficial inicial e final e entre a concentração de biomassa final e inicial para <i>Bacillus methylotrophicus</i> e <i>Bacillus pumilus</i>	53
Tabela 6 – Efeitos estimados das variáveis para <i>Bacillus methylotrophicus</i> , para fermentação submersa com soro de leite.	54
Tabela 7 – Efeitos estimados das variáveis para fermentação com <i>Bacillus pumilus</i> , para fermentação submersa com soro de leite.	55
Tabela 8 – Relação entre a tensão superficial inicial e final e entre a concentração de biomassa final e inicial para <i>Bacillus methylotrophicus</i> e <i>Bacillus pumilus</i>	62
Tabela 9 – Efeitos estimados das variáveis para <i>Bacillus methylotrophicus</i> , para fermentação submersa com permeado da ultrafiltração de soro de leite.	63
Tabela 10 – Efeitos estimados das variáveis para <i>Bacillus pumilus</i> , para fermentação com permeado da ultrafiltração de soro de leite.	64
Tabela 11 – Análise da medida de tensão superficial das bateladas para o ensaio de biorremediação.	70
Tabela 12 – Resumo dos íons caracterizados.	72
Tabela 13 – Análise de variância dos dados de liberação de CO ₂	74
Tabela 14 – Análise de variância dos dados de remoção do contaminante em função das variáveis.	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Soro de leite.....	16
2.2	Biossurfactantes.....	17
2.2.1	Microrganismos produtores de biossurfactantes	18
2.2.2	Técnicas de produção de biossurfactantes.....	21
2.2.3	Técnicas de recuperação de biossurfactantes	23
2.3	Biorremediação.....	25
2.3.1	Atenuação natural.....	27
2.3.2	Bioestimulação	27
2.3.3	Biorremediação de compostos oleosos com uso de biossurfactantes.....	28
2.3.4	Contaminante – Biodiesel.....	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Caracterização dos resíduos agroindustriais.....	33
3.2	Produção de biossurfactantes.....	34
3.2.1	Identificação dos microrganismos produtores de biossurfactantes	34
3.2.2	Microrganismos e manutenção de cepas	35
3.2.3	Preparo do meio de cultivo, inoculação e controles	35
3.2.4	Precipitação dos biossurfactantes	37
3.2.5	Identificação dos biossurfactantes produzidos	37
3.3	Ensaio de biorremediação do solo contaminado	37
3.4	Determinações analíticas	39
3.4.1	Determinação da tensão superficial do meio.....	39
3.4.2	Determinação da concentração da biomassa seca durante a produção de biossurfactantes.....	40
3.4.3	Determinação da atividade emulsificante.....	40
3.4.4	Determinação do teor de umidade.....	41
3.4.5	Determinação do CO ₂ liberado	41
3.4.6	Análise de óleos e graxas.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Caracterização dos resíduos.....	44
4.2	Identificação dos microrganismos produtores de biossurfactantes	45
4.3	Produção de biossurfactantes.....	47
4.3.1	Experimentos utilizando soro de leite como componente do meio de cultivo ...	47
4.3.2	Experimentos utilizando permeado da ultrafiltração do soro de leite como componente do meio de cultivo	56
4.3.3	Repetição dos experimentos nas condições de ensaio com melhores resultados de redução de tensão superficial	64
4.3.4	Produção de biossurfactantes para o ensaio de biorremediação e identificação do biossurfactante produzido	70
4.4	Ensaio de biorremediação.....	73
4.4.1	Remoção do contaminante.....	76
5	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A industrialização e o desenvolvimento econômico do Brasil exigiram grande estruturação da cadeia energética e devido a isto ocorreu um aumento do uso de derivados de petróleo e de biodiesel, o que resultou no acréscimo no número e na frequência de acidentes que ocasionam a contaminação do solo (CECCHIN et al., 2016), seja no transporte, em vazamentos nos sistemas de tancagem ou em postos de combustíveis (MEYER et al., 2014; SILVA et al., 2014).

As áreas contaminadas com compostos oleosos devem ser tratadas, e dentre as técnicas de remediação disponíveis, a biorremediação tem se destacado e apresentado crescimento de aplicação (GARGHOURI et al., 2011), por ser fundamentada em métodos naturais, menos agressivos e adequados para a manutenção do equilíbrio ecológico. No entanto, a solubilidade reduzida do biodiesel dificulta o acesso dos microrganismos e a consequente biodegradação do poluente uma vez que esses compostos hidrofóbicos se ligam às partículas do solo (MUKHERJEE et al., 2006; CHAPRÃO, 2015).

Para o aumento da biodisponibilidade dos compostos oleosos é o transporte da carga poluente para a fase aquosa. Desse modo, a utilização de compostos biossurfactantes surge como uma alternativa para a possível solução desse problema, pois aumentam as áreas superficiais dos compostos insolúveis que conduzem a um aumento da mobilidade e biodisponibilidade dos compostos, além disso, a interação com a superfície da célula aumenta a hidrofobicidade, permitindo que substratos hidrofóbicos possam se associar mais facilmente com células microbianas (BURGHOFF, 2012), e como consequência, melhoram a biodegradação e remoção dos compostos oleosos (NIEVAS et al., 2008; HAZRA et al., 2012), presentes no solo contaminado.

A utilização dos biossurfactantes em processos de biorremediação ainda é limitada pela competição com os surfactantes de origem sintética, que apresentam menor custo de produção. A produção competitiva de biossurfactantes requer o balanço correto dos componentes utilizados no preparo dos meios de cultivo dos processos fermentativo, a otimização das condições operacionais como temperatura, pH, solubilidade de oxigênio e agitação, (BOGNOLO, 1999) e a utilização de matéria-prima de baixo custo (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; BARROS et al., 2007).

Considerando que o Brasil é um país essencialmente agrícola, a facilidade de acesso aos subprodutos e resíduos agroindustriais é bastante significativa, motivando as pesquisas

nessa área (SILVA et al., 2014). Aliado a isso muitos efluentes gerados durante os processos das indústrias de alimentos apresentam dificuldade de tratamento, devido à elevada carga orgânica que apresentam, estando incluído nesta situação o soro de leite, que é um resíduo agroindustrial com elevadas concentrações de nutrientes, tais como proteínas, lactose e sais. As dificuldades enfrentadas pelas indústrias para efetuarem seu tratamento devem-se à sua alta carga orgânica (DOMINGUES et al., 1999; BRIÃO; TAVARES, 2007; ALVES et al., 2014). Esse fator dificulta a sua incorporação em processos de tratamento tradicional de efluentes e o torna altamente poluente, dificultando a adequação às exigências dos órgãos de fiscalização ambiental (FRIGON et al., 2009).

A utilização de soro na elaboração de compostos lácteos constitui-se numa forma racional de aproveitamento desse produto secundário, porém a quantidade de soro gerada é superior às necessidades do mercado, estima-se que somente 50% do soro é processado (BALDASSO et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2011). Dessa forma, destinos diferentes devem ser estudados para um melhor aproveitamento deste subproduto. Um dos métodos mais utilizados para o processamento do soro de leite e separação das suas funções proteicas é a ultrafiltração (AIRES, 2010). No entanto este processo gera enorme volume de permeado da ultrafiltração, o qual constitui um problema, haja vista que este geralmente é descartado em efluentes e possui alto potencial poluente (FONTES et al., 2015; SARON, 2003).

Neste sentido, a utilização desses resíduos pode diminuir os custos de produção de biossurfactantes para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento.

O Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental, em sua linha de pesquisa Infraestrutura Sustentável, tem desenvolvido vários trabalhos envolvendo biorremediação de solos contaminados com compostos oleosos. Esta dissertação enquadra-se na temática de aplicação de biossurfactantes produzidos a partir de efluentes industriais para remediar solo contaminado com biodiesel, expandindo o foco das pesquisas em biorremediação do Programa de Pós-Graduação.

O objetivo geral foi produzir biossurfactantes e utilizar estes biocompostos em processos de biorremediação *ex situ* de solo contaminado com biodiesel. Os objetivos específicos foram: a) Produzir biossurfactantes com microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel, por fermentação submersa a partir de soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite; b) Realizar a precipitação e identificação dos biossurfactantes produzidos; c) Utilizar os biossurfactantes produzidos em processo de

biorremediação *ex situ* de solo contaminado com biodiesel; d) Avaliar a influência dos biossurfactantes na retenção do contaminante em solo estéril.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soro de leite

O soro lácteo representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação do queijo ou na produção de caseína (PAGNO et al., 2009). É um subproduto de relevante importância, principalmente quando usado na indústria de alimentos, devido ao seu alto valor nutricional e propriedades funcionais (CHAGAS et al., 2005). Possui em sua composição de 93% a 95% de água, 3,8% a 4,2% de lactose, 0,8% a 1% de proteínas e 0,7% a 0,8% de minerais (PAGNO et al., 2009). Em função do elevado teor de água, o uso de soro lácteo em produtos alimentícios convencionais tem sido bastante limitado, principalmente pelo custo de secagem (BORGES et al., 2001). Apresenta também problemas de despejo, devido à sua alta carga orgânica, sendo considerado aproximadamente 100 vezes mais poluidor que o esgoto doméstico e, portanto, pode causar sérios problemas ambientais quando descartado de forma indevida. Por apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio, sua estabilização por métodos convencionais de tratamento é dificultada (BRAILE; CAVALCANTI, 1979; GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

Para cada litro de soro desperdiçado perdem-se cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteína com elevado valor nutricional e funcional (DOMINGUES et al., 1999). Logo, propor alternativas técnicas para um melhor aproveitamento do soro de leite é um desafio para melhorar a rentabilidade e competitividade da cadeia leiteira.

Outras opções podem ser viáveis para o soro de leite, tornando-o um subproduto de valor na indústria. A atual alternativa tem sido destinar este volume para a produção de soro de leite em pó e compostos lácteos, bem como sua utilização como insumo para a produção de bebida láctea, constituindo cerca de 50% das formulações de bebidas lácteas comercializadas (BALDASSO et al., 2011).

A utilização de soro na elaboração destes produtos constitui-se numa forma racional de aproveitamento desse produto secundário, porém a quantidade de soro gerada é superior às necessidades do mercado, estima-se que somente 50% do soro é processado (BALDASSO et al., 2011). Dessa forma, destinos diferentes devem ser estudados para um melhor aproveitamento deste importante subproduto.

A valoração do soro de leite envolve o uso da biotecnologia. O soro de leite, bem como a corrente de sais e lactose, pode ser utilizado em processos fermentativos de produção

de bioprodutos com elevado valor agregado, tais como enzimas, compostos antimicrobianos, bioemulsificantes e proteína de origem unicelular (*single cell protein*) (SISO, 1996; PESTA et al., 2007; SPALATELU, 2012), devido a sua composição rica em nutrientes. Os processos biotecnológicos têm contribuído de modo intenso para o uso de resíduos gerados em processos agroindustriais. Estes resíduos constituem-se matérias primas importantes para a composição de meios de cultivo em processos fermentativos, agregando valor a estes resíduos. Por outro lado, o uso destas matérias primas em substituição aos compostos comumente utilizados nos bioprocessos como meios de cultivo, pode contribuir para a diminuição dos custos de produção destes bioprodutos, tornando-os tecnologias mais acessíveis. Os bioprodutos, por sua vez, por serem obtidos através de vias naturais, encontrando aplicação mais bem aceita que aqueles similares obtidos através de processos de síntese química.

2.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas tensoativas, as quais são subprodutos metabólicos, principalmente de microrganismos. Eles apresentam pelo menos uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica e devido a isso se acumulam na interface óleo-água e superfície (LANG, 2002; MYERS, 2006; BANAT et al., 2010; MARCHANT; BANAT, 2012).

Segundo Luna et al (2013) em sua estrutura, a porção hidrofóbica pode ser tanto um ácido graxo de cadeia longa, um hidróxi-ácido graxo ou um α -alquil- β hidroxí ácido graxo. A porção hidrofílica, por sua vez, pode ser um carboidrato, ácido carboxílico, fosfato, aminoácido, peptídeo ou álcool. Devido a esta estrutura, ocorre a redução das forças de repulsão entre diferentes fases na interface ou superfície o que permite que as duas fases se misturem mais facilmente. Dessa forma, os biossurfactantes são definidos como compostos microbianos que exibem alta atividade surfactante e atividade emulsificante (MATSUURA, 2004; BANAT et al., 2010).

Os biossurfactantes classificam-se segundo sua composição química, com base no seu grupo funcional e quanto à origem microbiana (ACORSSINI, 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011), sendo que as principais classes de biossurfactantes incluem: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

A produção de biossurfactantes pode ser realizada por animais, plantas e microrganismos. No entanto, devido ao curto tempo de geração dos microrganismos quando comparados ao crescimento de animais e plantas, a produção é mais promissora e mais utilizada com bactérias, fungos e leveduras (LANG, 2002; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MARCHANT; BANAT, 2012). A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura na fase exponencial de crescimento microbiano, sendo que em certos casos este composto é produzido durante uma parte do ciclo de crescimento e então desativado ou incorporado em outro metabólito (MATSUURA, 2004).

Os biossurfactantes possuem propriedades físico-químicas similares às dos surfactantes sintéticos, entretanto apresentam vantagens, como: são compostos biodegradáveis e menos tóxicos ao meio ambiente, podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis, possuem maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade e ocorrem naturalmente no solo, o que os faz aceitáveis sob o ponto de vista ambiental (KOSARIC, 1992; DAS; MUKHERJEE, 2007; MULLIGAN, 2009)

Apesar das vantagens dos biossurfactantes com relação aos surfactantes sintéticos e do conhecimento que se tem sobre as técnicas de produção, a comercialização de surfactantes microbianos não foi totalmente alcançada, em grande parte devido aos custos de produção. Este alto custo pode ser tolerado quando o biossurfactante é usado em pequenos volumes como em cosméticos e medicamentos, mas quando são necessários grandes volumes como no caso da biorremediação, o custo fica incompatível com a sua aplicação (HENKEL et al., 2012).

A redução destes gastos pode ser realizada a partir de diferentes estratégias as quais podem tornar o processo mais viável, incluindo, o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, com a otimização das condições de fermentação e processos de recuperação, desenvolvimento de cepas super produtoras e uso de substratos alternativos (KOSARIC, 1992; RAZA et al., 2009). Todas essas características relevantes contribuem para uma elevada aplicabilidade dos biossurfactantes, que atualmente são utilizados em vários ramos industriais, agrícolas e principalmente ambientais (MARCHANT; BANAT, 2012; MUTHUSAMY et al., 2008; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; KITAMOTO et al., 2002).

2.2.1 Microrganismos produtores de biossurfactantes

Existem vários tipos de microrganismos conhecidos que são capazes de produzir biossurfactantes. No Quadro 1, adaptado de Soberón-Chávez e Maier (2011) estão

representados alguns dos principais tipos de biossurfactantes e os seus microrganismos produtores.

Quadro 1 – Principais classes de biossurfactantes e os seus microrganismos produtores.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
GLICOLIPÍDIOS	
Raminolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, Torulopsis apícola</i>
Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Mycobacterium sp.</i>
LIPOPEPTÍDIOS E LIPOPROTEÍNAS	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDIOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDIOS	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolípidios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
SURFACTANTES POLIMÉRICOS	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
SURFACTANTES PARTICULADOS	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: Adaptado de Soberón-Chávez; Maier (2011).

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura são de origem bacteriana, sendo que as bactérias produtoras mais reportadas são dos gêneros, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, e *Acinetobacter sp.* (MULLIGAN, 2009).

As *Pseudomonas sp.* produzem biossurfactantes do tipo raminolipídio, os quais são extensamente estudados. Consistem de uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, com 8 a 12 átomos de carbono, que podem ser saturados ou insaturados (SIM et al., 1997). Os biossurfactantes produzidos podem reduzir a tensão superficial a valores entre 25 mN/m e 30 mN/m (PARRA et al., 2006).

As bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente encontradas no solo, devido à sua capacidade de suportar variações das condições ambientais, se adaptando facilmente a diversos habitats, possuindo capacidade de produzir biossurfactantes do grupo dos lipopeptídios, dentre os quais, o que mais se destaca é a surfactina, um dos que possui maior atividade superficial. Os surfactantes produzidos por diferentes linhagens de *Bacillus*, além de serem obtidos por processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental, apresentam efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e remoção de compostos oleosos de solo contaminado (BARROS, 2007).

Com relação aos microrganismos do gênero *Acinetobacter*, estes produzem compostos de elevado peso molecular, denominados bioemulsificantes, os quais são polímeros anfílicos e polifílicos que são geralmente mais eficazes na estabilização de emulsões de óleo em água (SMYTH et al., 2010), contribuindo assim para os processos de biorremediação.

No que diz respeito ao desenvolvimento de espécies mais produtoras, a manipulação genética de espécies selecionadas permanece limitada. Embora manipulações com espécies de *Bacillus sp.* e *Acinetobacter sp.* têm sido relatadas, a maioria dos estudos de manipulação genética têm sido realizados com *P. aeruginosa*, isso ocorre devido ao seu potencial comercial e ao conhecimento mais detalhado do seu genoma (BANAT et al., 2010).

Tahzibi et al. (2004) fizeram um estudo utilizando N-metil-N'-nitrosoguanidina para a mutagênese aleatória em cepas de *P. aeruginosa*. Isto resultou no aumento da produção de raminolipídios em dez vezes em relação as espécies selvagens. A capacidade de desenvolver uma espécie super produtora de *P. aeruginosa*, no entanto, é uma tarefa difícil, devido à complexidade da rede de regulação da transcrição dos genes envolvidos na produção de raminolipídios, e isto é ainda mais complicado pelo fato de os raminolipídios serem produzidos por uma mistura de congêneres (CHA et al., 2008).

A maior produção de biossurfactantes, através de cepas super produtoras pode ser obtida uma vez que o mecanismo de regulação da produção de biossurfactantes seja totalmente conhecido (HSUEH et al., 2007).

2.2.2 Técnicas de produção de biossurfactantes

As técnicas biotecnológicas para produção de metabólitos de microrganismos, entre os quais estão os biossurfactantes, relatadas na literatura são, basicamente, a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. Estas duas técnicas diferem, sobretudo, no teor de água contido nos meios de cultivo. Enquanto na fermentação submersa a água é o solvente e os substratos estão dissolvidos no meio, a fermentação em estado sólido utiliza substratos sólidos, nos quais a água é um dos componentes e está presente em teores que variam de 30% a 70% (MITCHELL et al., 2006).

A produção de biossurfactantes, tanto em laboratório como em processos industriais, tem sido realizada principalmente por fermentação submersa, a qual é geralmente acompanhada pela determinação qualitativa da tensão superficial do sobrenadante do cultivo e, quantitativamente, pela determinação de açúcares no meio, no caso de raminolipídios, ou ainda, por técnicas cromatográficas para a análise de lipopeptídios (SANTOS, 2001).

De acordo com Lima (2007) muitos substratos alternativos têm sido sugeridos para a produção de biossurfactantes, especialmente resíduos de águas miscíveis como, melaço, soro de leite e resíduos destilados. A utilização de produtos ou subprodutos industriais está relacionada principalmente a produtos puros como carboidratos e óleos vegetais, e em menor proporção relacionada a resíduos hidrofóbicos como substratos gerados por frituras de alimentos provenientes de óleos vegetais, sendo que isto diminui significativamente os custos de produção.

Vários estudos foram desenvolvidos com relação à otimização das condições dos meios de cultivo. Zhou e Kosaric (1995), utilizando como fonte de carbono óleo de canola e lactose, presente no soro do processamento de queijo, para a produção de biotensoativos com *Candida bombicola*, obtiveram rendimentos de 90-110 g/L. Os autores determinaram, ainda, uma diminuição da tensão superficial (interface ar/água) de 72 para 33 mN/m e da tensão interfacial (interface óleo/água) de 40 para 1 mN/m.

Patel e Desai, (1997) utilizaram melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, para produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* GS3. A linhagem mostrou-se perfeitamente capaz de utilizar essas

fontes renováveis e relativamente de baixo custo, para a produção de biossurfactantes, sem adição de nutrientes. Utilizando-se 7% (v/v) de melão e 0,5% (v/v) de água de maceração de milho, obteve-se 0,24 g/L de ramnose após 96 h de incubação. A tensão interfacial contra petróleo foi reduzida de 21 mN/m para 0,47 mN/m, e o teste de emulsificação apresentou emulsões estáveis para n-alcanos, aromáticos, petróleo e óleos vegetais.

Das e Mukherjee (2007) compararam a produção de biossurfactante por duas cepas de *Bacillus* por fermentação submersa e fermentação em estado sólido, utilizando cascas de batata como substrato. A quantidade de biossurfactante produzido foi similar em ambos os sistemas, com produções de 102 g/L na fermentação submersa e 92 g/kg SS em fermentação em estado sólido.

Abdel-Mawgoud et al. (2008) estudaram a produtividade de *B. subtilis* usando melão como fonte de carbono e obtiveram um rendimento de 1,12 g/L. Ohno et al. (1995), estudaram a produção de biossurfactantes utilizando como substrato o resíduo fermentado de soja para linhagens de *B. subtilis* geneticamente modificadas, que produziram a surfactina, na quantidade de 2,0 g/kg SS (grama por quilograma de substrato seco).

Para estudos da produção de raminolipídios por fermentação, Camilios Neto et al. (2008) relataram a otimização da produção por *P. aeruginosa* UFPEDA 614. Neste caso, utilizou-se uma mistura de substratos composta por 50% de bagaço de cana-de-açúcar e 50% de farinha de semente de girassol, obtendo-se, após 288 h de cultivo, uma produção de 172 g/kg SS.

Rodrigues et al. (2006) estudaram o uso de meio de cultivo alternativo, com soro de leite e melão, para produção de biossurfactante por *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus*, sendo utilizado meio sintético como controle. Quando os meios sintéticos foram substituídos por meios alternativos mais baratos, as fermentações foram conduzidas de forma eficaz com altos rendimentos e produtividades de biossurfactantes. Houve um aumento de 1,2 a 1,5 vezes da massa de biossurfactante produzido e 60% a 80% de redução dos custos dos meios de cultivo, para ambas as linhagens. Desse modo os autores concluíram que os meios de cultivo alternativos, soro de leite e melão, quando suplementados, podem ser usados como alternativa relativamente barata.

Rodrigues e Teixeira (2008) avaliaram o uso de soro de leite como meio de cultivo alternativo, comparado com o meio sintético convencional na fermentação de dois microrganismos. Para o *L. lactis*, o meio de cultivo era composto por soro de leite com 50 g/L de lactose, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona, sendo que a massa produzida de biossurfactante por peso seco de células aumentou 1,2 vezes, com uma

estimativa de diminuição de 60% nos custos de preparação do meio comparado com o meio sintético. Foram obtidas conclusões similares para o microrganismo *S. thermophilus*, em que a utilização do meio composto por soro de leite (50 g/L de lactose) suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona, resultou em um aumento do rendimento da produção de 1,5 vezes, com uma redução de cerca de 60% nos custos.

2.2.3 Técnicas de recuperação de biossurfactantes

O processo biotecnológico de produção de biossurfactantes está estabelecido há alguns anos, no entanto, os processos de *downstream* têm impedido a ampla utilização destes compostos devido aos altos custos. Para muitos produtos biotecnológicos, os custos dos processos de *downstream* representam 60% do valor total de produção (DESAI; BANAT, 1997). Assim, um fator importante para determinar a viabilidade de um processo de produção em escala comercial é a disponibilidade de técnicas de *downstream* adequadas e econômicas (MUKHERJEE et al., 2006).

Na produção de biossurfactantes, as técnicas de *downstream* envolvem a recuperação, concentração e purificação, sendo que o método adequado para o processamento depende do tipo e natureza dos substratos, da técnica de fermentação e das propriedades físico-químicas dos biossurfactantes excretados (SEN; SWAMINATHAN, 2005). Os biossurfactantes podem ser intracelulares ou extracelulares. Os extracelulares deverão ser extraídos do meio de cultivo após a separação das células, enquanto que os biossurfactantes intracelulares dependem do rompimento das células associada a processos posteriores de recuperação, que podem incluir precipitação com ácidos ou sais, extração com solvente, cristalização, e centrifugação (DESAI; BANAT, 1997).

Dependendo da natureza da molécula, comumente os solventes utilizados são o acetato de etila (YIN et al., 2009), acetona (ABOUSEOUD et al., 2008), diclorometano (JOSHI et al., 2008), clorofórmio-etanol (2:1) (LOTFABAD et al., 2009) e clorofórmio-metanol (2:1) (PANSIRIPAT et al., 2010). Após a remoção do solvente por evaporação rotativa a 40 °C, o produto pode ser purificado por coluna cromatográfica e cristalizado (DUBEY; JUWARKAR, 2001). Quando recuperados por precipitação, pode-se utilizar sais como o sulfato de alumínio (SCHENK et al., 1995) e sulfato de amônio (MUKHERJEE et al., 2006), além de ácidos como HCl e o H₂SO₄ (SARIN; SARIN, 2008).

Essas técnicas já se encontram bem estabelecidas para aplicações em escala laboratorial, no entanto, um dos inconvenientes mais importantes destes métodos de

recuperação convencionais é que eles são demorados. Além disso, os solventes orgânicos voláteis e as substâncias químicas utilizadas para a extração de solvente, também são dispendiosos, poluentes do ar e tóxicos para a saúde. Assim, é necessário desenvolver técnicas mais econômicas e ambientalmente amigáveis para recuperação de biossurfactantes (SEN; SWAMINATHAN, 2005).

Alguns métodos não convencionais de recuperação estão sendo estudados, os quais levam em consideração a atividade superficial e a capacidade de formar micelas dos biossurfactantes, sendo aplicáveis para a recuperação de biossurfactantes extracelulares em meios de cultivo. Alguns exemplos de tais estratégias de recuperação de biossurfactantes incluem fracionamento de espuma, ultrafiltração, adsorção-dessorção com resinas de poliestireno, adsorção-dessorção com carvão ativado à base de madeira e cromatografia de permuta iônica (MUKHERJEE et al., 2006). Uma das principais vantagens destes métodos é a sua capacidade para operar de um modo contínuo e com elevado grau de pureza.

Sarachat et al. (2010) estudaram o fracionamento de espuma para a recuperação de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* SP4, a partir de um caldo nutritivo com óleo de palma como fonte de carbono. A técnica de fracionamento de espuma foi utilizada para a recuperação do biotensoativo excretado a partir do meio de cultura livre de células. Esta técnica baseia-se no fenômeno de adsorção das moléculas tensoativas na interface gás-líquido, onde é realizada a injeção de gás pela base de uma coluna e à medida que as bolhas de gás ascendem através da solução, moléculas são concentradas na interface gás-líquido e transportadas para a fase espuma que se formará quando as bolhas enriquecidas em substâncias tensoativas saem da fase líquida. A espuma gerada pode ser removida obtendo-se uma solução enriquecida no soluto tensoativo (LUCENA; SANTANA, 2000). Os resultados do referido estudo mostraram que as condições operacionais foram otimizadas proporcionando uma recuperação de 97% do biossurfactante e uma razão de enriquecimento de 4.

Dimitrov et al. (2008) aplicaram processos de extração de membrana líquida para a recuperação de surfactina. Este processo opera em sistemas de três fases de líquido, sendo duas soluções aquosas, uma solução de alimentação e uma solução receptora, separadas por um líquido orgânico, que representa a "membrana de líquido", a qual é insolúvel em ambas as soluções aquosas. Os compostos biossurfactantes são transportados a partir da alimentação para a solução receptora através da membrana líquida orgânica, sendo separados (LI et al., 2008). Neste estudo obteve-se 97% de eficiência de recuperação em condições otimizadas.

Chen e Juang, (2008), otimizaram a recuperação de surfactina de caldos de fermentação de *B. subtilis* por diferentes métodos e alcançaram uma melhor pureza, por adsorção e troca iônica, após o caldo ter sido tratado por processo de ultrafiltração em duas etapas.

Kuyukina et al. (2001) utilizaram éter metil-terc-butílico (MTBE) como solvente para a extração de biossurfactantes de culturas bacterianas de *Rhodococcus*. Após a comparação com outros sistemas de solventes mais conhecidos utilizados para a extração destes compostos verificou-se que o MTBE foi capaz de realizar extração com elevada recuperação do produto. Devido a certas características de MTBE, tais como toxicidade relativamente baixa, biodegradabilidade, baixa inflamabilidade e fácil utilização em técnica de *downstream*, a utilização deste solvente como um agente de extração, em escala industrial de produção de biossurfactantes é viável.

Reiling et al. (1986), estudaram a produção de biossurfactante em planta piloto e o processo do *downstream* adaptado a escala maior. A produção foi realizada em biorreator de 23 L utilizando glicose como fonte de carbono. Para o enriquecimento do biossurfactante, os autores utilizaram o caldo fermentado livre de células, sendo este purificado em duas etapas. A primeira etapa utilizou cromatografia de adsorção em uma resina de poliestireno, onde a adsorção foi acompanhada através da tensão superficial medida em cada amostra. Na segunda etapa uma purificação adicional foi realizada com cromatografia de troca iônica. O produto obtido foi 90% puro, e a recuperação total do material ativo foi acima de 60% com o processamento utilizado.

Muitas vezes, uma única técnica de processamento *downstream* não é suficiente para a recuperação do produto e sua purificação. Desse modo, a recuperação pode ser realizada em múltiplas etapas, usando uma sequência de passos de purificação e concentração (REILING et al., 1986) o que faz com que as indústrias produtoras de biossurfactantes possam produzir biossurfactantes com uma ampla gama de aplicações.

2.3 Biorremediação

Os processos biológicos são uma tecnologia promissora para a remoção de contaminantes (SZULC et al., 2014) e sobressaem-se por serem fundamentados em métodos naturais e relativamente simples, sendo menos agressivos e mais adequados para a manutenção do equilíbrio ecológico (ORTEGA-CALVO et al., 2013).

O conceito de biorremediação pode sofrer algumas alterações de acordo com o autor, no entanto, de uma forma geral, é um processo que se baseia em reações químicas realizadas por microrganismos sobre contaminantes presentes no ambiente natural. Essa ação microbiana é capaz de modificar ou decompor o composto original em formas mais simples, menos tóxicas ou atóxicas (MHATRE; KUNDE, 2014), sendo a mineralização do contaminante o benefício máximo alcançado nesse processo (DELLAGNEZZE et al., 2014). A meta final para biorremediação é a conversão de resíduos orgânicos em biomassa e sub-produtos inertes do metabolismo microbiano como o CO₂ e água (CHIRWA; WANG, 2000).

A biorremediação engloba uma série de tecnologias e técnicas distintas para tratamento não só de solos, mas também de águas contaminadas e outros resíduos, que podem ser classificadas em processos de tratamento *in situ* ou *ex situ*. Nos processos *in situ*, a remediação biológica é feita no próprio local de contaminação, sem a extração do meio contaminado. Já os processos *ex situ*, exigem a remoção e transporte do solo contaminado para um local adequado (RAMIREZ et al., 2014). A utilização dessa tecnologia, quando comparada à tecnologia *in situ*, apresenta a vantagem da facilidade de manipulação dos fatores ambientais que influenciam a biodegradação do contaminante tais como pH, temperatura, concentração de nutrientes, umidade e aeração (ZOUBOULIS; MOUSSAS, 2011). Além disso, a área de disposição do solo é frequentemente impermeável reduzindo a lixiviação do contaminante para o solo não contaminado evitando consequente contaminação das águas subterrâneas. Geralmente, os casos em que a biorremediação é realizada *ex situ* estão relacionados com altas concentrações de contaminantes, necessitando de estratégias mais eficientes de recuperação desses resíduos (MOHAN et al., 2006). As técnicas de biorremediação *ex situ* mais aplicadas são *landfarming*, biopilhas, compostagem e biorreatores.

O processo da biorremediação pode ocorrer naturalmente pela ação dos microrganismos autóctones, processo denominado atenuação natural. No entanto, em geral, os solos apresentam limitações nutricionais que submetem os microrganismos a condições entravantes, o que reduz a eficácia da biorremediação. Nesses casos o solo pode receber a introdução de nutrientes, que estimularão o metabolismo microbiano e contribuirão para o aumento das chances de sucesso do tratamento. A estimulação dos microrganismos pela introdução de fontes nutricionais é denominada bioestimulação (DELLAGNEZZE et al., 2014).

2.3.1 Atenuação natural

A atenuação natural inclui uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, os quais, dentro de condições favoráveis, permitem a redução de massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentrações de contaminantes no solo ou água subterrânea sem intervenção humana (USEPA, 1999). Este processo ocorre naturalmente em qualquer área contaminada, com variável grau de eficiência, dependendo dos tipos e concentrações de contaminantes presentes e dos processos característicos do local.

A biorremediação de compostos oleosos por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados no meio ambiente (TAPAJÓS et al., 2008). A capacidade de degradar esses compostos é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras (TRINDADE, 2002). Esses microrganismos podem ser encontrados no solo, em ambientes marinhos e de água doce.

A remediação natural não é uma alternativa de “nenhuma ação de tratamento”, mas uma forma de minimizar os riscos para o meio ambiente, através do monitoramento do deslocamento da pluma, assegurando que pontos como poços de abastecimento de água, rios, lagos, não sejam contaminados (CORSEUIL; MARINS, 1998). Contudo, este processo natural pode ser limitado pela falta de nutrientes, elétrons receptores ou ambos. Em muitos locais, o processo de biodegradação fica limitado as zonas periféricas da área contaminada, pois a presença de contaminante em elevadas concentrações torna o ambiente extremamente hostil a proliferação de microrganismos (RABUS; HEIDER, 1998).

2.3.2 Bioestimulação

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação. O processo de bioestímulo é uma das estratégias mais adotadas em tratamentos de recuperação de áreas impactadas. Esta técnica consiste na correção das condições ambientais, tais como nutrientes, oxigênio e umidade para aumentar a atividade da população microbiana existente nas áreas contaminadas (MILLER, 2010).

Os microrganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais

rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de microrganismos, causada pelo incremento dos níveis de nutrientes (SARKAR et al., 2005).

A suplementação de nutrientes para a degradação de hidrocarbonetos tem sido, tradicionalmente, focada na adição de fontes de N e P, tanto orgânicas quanto inorgânicas (DELLAGNEZZE et al., 2014). Devido ao fato do carbono ser o principal constituinte de compostos oleosos, a sua dosagem tem sido considerada como um índice para a determinação das quantidades de N e P que necessitam ser adicionadas para atingir a ótima relação C:N:P (RISER-ROBERTS et al., 1998). A relação C:N:P de 100:10:1 no solo a ser biorremediado tem sido normalmente recomendada (RISER-ROBERTS, 1998; CHENG; MULLA, 1999).

No processo de bioestimulação os microrganismos se nutrem dos múltiplos compostos orgânicos para o desenvolvimento de seu metabolismo de manutenção e reprodução culminado na remoção do contaminante (KANISSERY; SIMS, 2011).

2.3.3 Biorremediação de compostos oleosos com uso de biossurfactantes

A utilização de biossurfactantes em processos de biorremediação tem se tornado um método promissor para melhorar a eficácia do tratamento de ambientes contaminados (NGUYEN et al., 2008). Comparados com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes, em geral, exibem forte compatibilidade ambiental, maior atividade superficial, toxicidade reduzida e alta biodegradabilidade (MULLIGAN, 2009). Por essa razão, os biossurfactantes são fortes candidatos à utilização na biorremediação de solos contaminados e ambientes aquáticos (MARCHANT; BANAT, 2012), além de poderem ser produzidos por fontes renováveis como a fermentação microbiana, apresentando, assim, vantagem química frente aos similares sintéticos (CHAPRÃO, 2015). Segundo Banat et al. (2010) misturas microbianas e de biossurfactantes são comercializadas por algumas empresas para utilização em biorremediação.

Os biossurfactantes aumentam as áreas da superfície dos compostos insolúveis que conduzem a um aumento da mobilidade e biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, além disso, a interação com a superfície da célula aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos possam se associar mais facilmente com células bacterianas, como consequência, melhoram a biodegradação e remoção dos compostos oleosos. A adição dos biossurfactantes aumenta a biodegradação dos hidrocarbonetos através dos mecanismos de mobilização, solubilização ou emulsificação (NIEVAS et al., 2008).

O mecanismo de mobilização ocorre em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC) do biotensioativo. Nessas concentrações, os biossurfactantes reduzem a tensão superficial e interfacial entre os sistemas ar/água e solo/água, fazendo com que o ângulo de contato dos biossurfactantes com o sistema solo/óleo aumente, reduzindo a força capilar, fazendo com que o óleo e o solo fiquem próximos (URUM; PEKDEMIR, 2004).

Por sua vez, acima da CMC do biossurfactante, ocorre o processo de solubilização. Nessas concentrações as moléculas de biossurfactantes associam-se para formar micelas, o que aumenta muito a solubilidade do óleo. As extremidades das moléculas hidrofóbicas dos biossurfactantes ligam-se no interior da micela enquanto que as extremidades hidrófilas estão expostas à fase aquosa do exterior. Consequentemente, o interior da micela cria um ambiente compatível para moléculas orgânicas hidrofóbicas (URUM, PEKDEMIR, 2004).

A emulsificação, que também ocorre acima da CMC, é um processo que forma uma emulsão, contendo gotículas muito pequenas de gordura ou óleo em suspensão em um líquido, geralmente a água. Os biossurfactantes de elevado peso molecular são agentes emulsionantes eficazes e são muitas vezes aplicados como aditivos para estimular a biorremediação e a remoção de substâncias de petróleo a partir de ambientes contaminados (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

Moldes et al. (2011) avaliaram a influência da adição de biossurfactantes provenientes de *Lactobacillus pentosus* para a eficiência da biodegradação de octano no solo pela microbiota autóctone. Após 15 dias, a eficiência da biodegradação atingiu 59% e 63% para o solo contaminado com 700 mg/kg e 70000 mg/kg de octano, na presença de biossurfactantes, enquanto que na ausência, a taxa de remoção foi de 1% e 24%, respectivamente. Os autores, concluíram que a mobilização das moléculas de octano e consequente aumento na sua biodisponibilidade foram as principais causas das diferenças observadas.

Com relação à aplicação dos biossurfactantes em processos de biorremediação, as moléculas podem ser adicionadas externamente, por meio de processos de pulverização, injeção ou podem ainda ser produzidos no local, o que tem sido bastante estudado e parece ser uma técnica promissora no caso de tratamento *in situ*. Neste último caso, a produção de biossurfactantes pode ser obtida por bioaumento com microrganismos adequados para produção de biossurfactantes, uma vez que os microrganismos autóctones raramente apresentam eficiência satisfatória (LAWNICZAK et al., 2013).

Um estudo feito *in situ*, no deserto no Kuwait, com areias contaminadas com petróleo revelou que houve uma redução de 82,5% de hidrocarbonetos totais de petróleo e redução de 90,5% de n-alcanos, em um período de 12 meses (AL-AWADHI et al., 1992).

O derramamento de óleo do navio Exxon Valdez perto de Prince William Sound em março de 1989 é um exemplo de grande contaminação, onde houve o vazamento de cerca de 40 mil toneladas de óleo bruto. Conseqüentemente, a ação de descontaminação foi uma das mais caras para um derramamento de petróleo a partir de um navio, com mais de 10.000 trabalhadores atuando nas operações de limpeza. O custo de limpeza para o primeiro ano foi mais de US\$ 2 bilhões. A empresa Exxon Mobil teria gasto em torno US\$ 4,3 bilhões, como consequência do derramamento, incluindo os custos de limpeza e vários acordos judiciais (ARROZ, et al., 1996).

Durante as fases iniciais de vazamento foi realizada a lavagem física com jatos de água a alta pressão, ensaios de queimadura experimental *in-situ* e a utilização de um grande número de navios, no entanto, menos de 10% do volume de vazamento original foi recuperado na superfície do mar. Subseqüentemente, biossurfactantes foram aplicados nas áreas poluídas para acelerar o crescimento e a atividade dos microrganismos degradadores de petróleo. Duas a três semanas depois, as regiões tratadas com os biossurfactantes estavam significativamente mais limpas do que as áreas controle. No entanto, foi difícil avaliar os efeitos de tratamento devido à heterogeneidade da contaminação (SATPUTE et al., 2010).

Shafeeq et al. (1989) relataram a produção de biossurfactants por *P. aeruginosa* S8, a qual foi isolada a partir de água do mar contaminada com óleo, e a degradação de hexadecano, heptadecano, octadecano e nonadecano, *in situ*, foi de 47%, 58%, 73% e 60%, respectivamente.

Chhatre et al. (1996) descreveram a degradação de 70% de petróleo por 4 microrganismos isolados de petróleo bruto em um campo de petróleo em Bombaim. Além disso, um dos microrganismos produziu biossurfactante do tipo raminolípido que, conseqüentemente, aumentou a biodegradação do petróleo.

Li et al. (2002) estudaram a remediação de solo poluído por hidrocarbonetos de petróleo através da técnica de biorremediação *ex situ*, biopilhas que receberam suplementação de nutrientes e palha de arroz como material para melhoria das características do solo quanto à aeração. Durante 53 dias de operação, 38% a 57% do total do óleo presente no solo foi biodegradado. Esses autores concluíram que o sistema de biopilhas apresentou-se como uma tecnologia eficiente de biorremediação de baixo custo.

Mccarthy et al. (2004) realizaram a remediação de 3.600 m³ de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, durante 55 dias no Alasca com a técnica de biorremediação *ex situ*, *landfarming*. A concentração do contaminante antes e após o tratamento teve uma variação de 1400 mg/kg a 430 mg/kg, respectivamente.

Um sistema de biopilha aerada foi utilizado para tratar 15.000 m³ de solo contaminado por compostos oleosos em Savitok Point, Canadá. As concentrações do contaminante foram reduzidas de 7000 mg/kg para 800 mg/kg no período de dois anos (ESG, 2001).

2.3.4 Contaminante – Biodiesel

O aumento no consumo de combustível, e as preocupações sobre a escassez de petróleo, criaram a necessidade do uso de biocombustíveis (THOME, et al., 2014). Um exemplo é o biodiesel, o qual fornece uma fonte alternativa de energia para uso em motores a diesel (HUANG et al. 2012), e contribui com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental e é fonte estratégica de energia renovável em substituição aos derivados de petróleo (NETO et al., 2005).

No Brasil, o uso de biodiesel adicionado ao diesel é obrigatório nos termos da Lei 11.097/2005 (BRASIL, 2005). Em janeiro de 2008, 2% de biodiesel foi requerido para ser adicionado ao óleo diesel de acordo com a Agência Nacional do Petróleo. Esta percentagem subiu para 4% em 2009, 5% em 2010, 6% em julho e 7% em novembro de 2014. Em março 2016 foi aprovado o índice da mistura de 8% até 2017, com o incremento de um ponto percentual a cada 12 meses, ou seja, 9% até 2018; e 10% até 2019 (BRASIL, 2016).

As propriedades físico-químicas do biodiesel variam conforme a composição de ácidos graxos do elemento empregado na sua produção (LIN et al., 2011). Quimicamente, os óleos e gorduras consistem em moléculas de triacilglicerídeos, constituídas por três ácidos graxos de cadeia longa ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol.

Segundo Schüller (2000) a obtenção de biodiesel é realizada pela reação de transesterificação de óleos vegetais ou animais com um álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador, usualmente NaOH ou KOH (PASQUALINO et al., 2006) e como co-produto da reação a glicerina.

A biodegradabilidade do biodiesel é favorecida pela presença de cadeias C16-C18 (ácidos graxos), ausência de moléculas aromáticas, propriedades higroscópicas e disponibilidade de ligações éster de alta energia (PASSMAN; DOBRANIC, 2005). Porém, apresenta também algumas vulnerabilidades, como a suscetibilidade à biodeterioração em sistemas de estocagem e a liberação de óxidos de nitrogênio (NOx) durante sua combustão (DEMIRBAS, 2009).

A adição de biodiesel ao diesel pode promover efeitos simultâneos, contribuindo para o aumento da biodegradabilidade dos hidrocarbonetos à medida que a sua concentração é

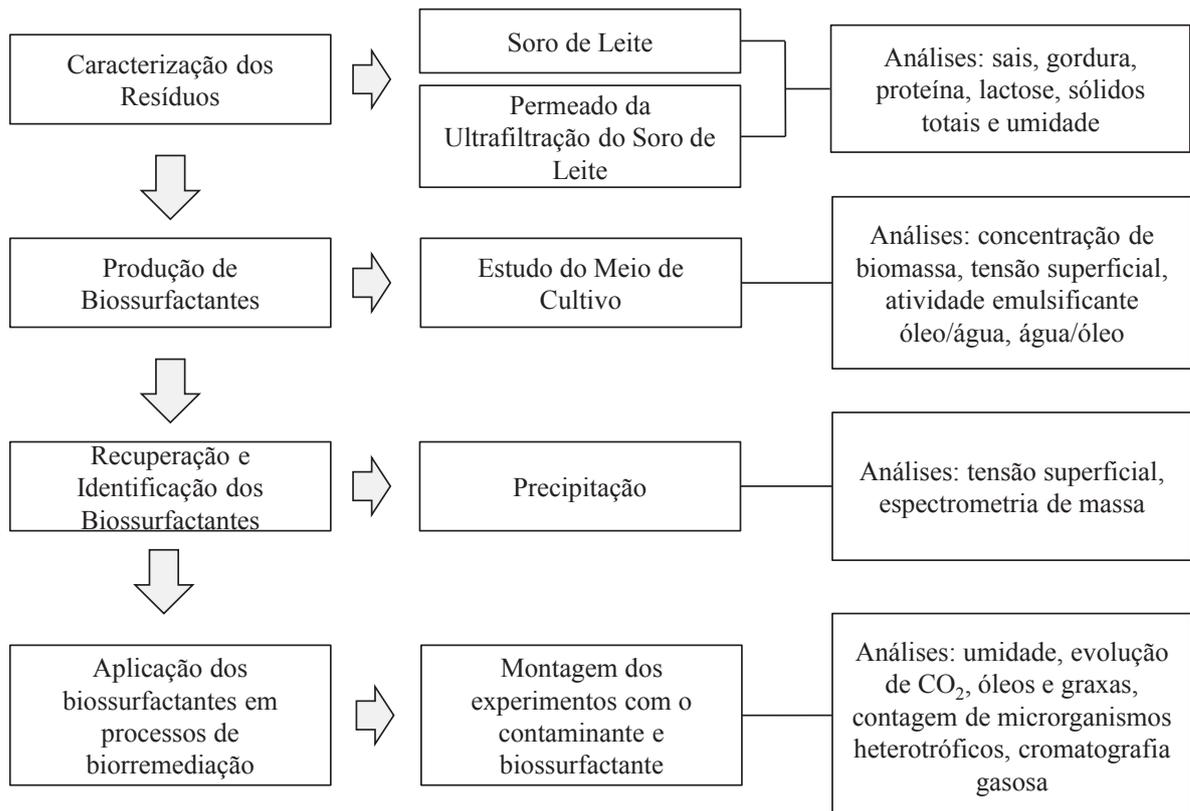
aumentada na mistura, devido ao fenômeno do cometabolismo (PASQUALINO et al., 2006), sendo relatado que a biodegradabilidade do biodiesel pode ser até cinco vezes mais rápida do que do diesel, inclusive em solos (FERELLA et al., 2010).

Ainda muito pouco é sabido sobre como se dá a biodegradação das frações de diesel/biodiesel no solo, devido ao fato de essa nova mistura de combustível ter sido inserida recentemente na matriz energética mundial. Devido a isso, vem se trabalhando em inúmeras pesquisas para entender o comportamento dessa mistura no solo, uma vez que vazamentos e derrames acidentais durante o refino, o transporte e estocagem são uma problemática (MEYER, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 1 apresenta as etapas da metodologia empregada para atingirem-se os objetivos delineados.

Figura 1 – Esquema da metodologia experimental.



3.1 Caracterização dos resíduos agroindustriais

Foi realizada a caracterização do soro de leite e do permeado da ultrafiltração do soro de leite através de análises físico-químicas de sais, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e umidade. O teor de sais foi determinado por secagem em mufla a 500° (AOAC, 1995; MAPA, 2006), e o teor de gorduras por espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) (MAPA, 2006; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2000). A determinação de proteínas foi realizada por espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) e pelo método Kjehdal (AOAC, 2005; MAPA, 2006; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2000), a lactose foi determinada por espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) e pelo método de Lane-Eynon (MAPA, 2006). A umidade foi determinada através da secagem em estufa a 105°C (AOAC, 1995; MAPA, 2006; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) e o teor de sólidos totais por

espectroscopia no infravermelho próximo (FTIR) e secagem em estufa a 105°C (AOAC, 1995; MAPA, 2006; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.2 Produção de biossurfactantes

3.2.1 Identificação dos microrganismos produtores de biossurfactantes

Os microrganismos foram isolados de solo contaminado pelo vazamento de óleo diesel, em um posto de combustível, no município de Passo Fundo, RS, no ano de 2009. O isolamento foi realizado a partir de uma amostra do solo contaminado realizando-se diluições seriadas e plaqueamento. As colônias foram sucessivamente isoladas, testadas e posteriormente mantidas em tubos com ágar inclinado em refrigerador a 4 °C (DECESARO et al., 2013).

A identificação dos microrganismos produtores de biossurfactantes foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Divisão de Recursos Microbianos (DRM), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), sendo realizada a identificação molecular da linhagem dos microrganismos utilizando sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S.

As amostras foram repicadas em placa de Petri contendo meio de cultura apropriado. Para extração do DNA genômico, uma alçada de cultura foi diluída em 5 µL de água deionizada estéril e aquecida a 95°C por 3 min em termociclador.

A metodologia consistiu na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das culturas. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação da PCR foram p10f e p1100r, complementares às extremidades conservadas do gene ribossomal 16S dos microrganismos. Os produtos de amplificação foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando um sequenciador automático.

As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em uma sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos e comparadas com a sequência de organismos representados na base de dados do GenBank e do RDP (Ribosomal database Project). Foram então selecionadas sequências de microrganismos relacionado aos microrganismos a serem identificados para realização da análise filogenética. As sequências de análise foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas

utilizando o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 1997). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 6.0.

3.2.2 Microrganismos e manutenção de cepas

Para a multiplicação das células, para dar início ao processo fermentativo, os inóculos dos microrganismos foram preparados em meio PC (*Plate Count*), composto por triptona (5 g/L), extrato de levedura (2,5 g/L) e glicose (1g/L), a partir de tubos contendo os microrganismos isolados em meio PCA (*Plate Count Ágar*). Em erlenmeyers de 250 mL foi adicionado 50 mL do meio PC, o qual foi inoculado com 2 alçadas de colônias por erlenmeyer, com posterior incubação em agitador orbital por 48 h a 30 °C.

3.2.3 Preparo do meio de cultivo, inoculação e controles

Inicialmente os resíduos foram submetidos a um pré-tratamento, no qual o pH dos mesmos foi ajustado para 4,0 com HCl (1,0 mol/L) com posterior ebulição durante 10 min. Após arrefecimento, o pH foi ajustado com NaOH (1,0 mol/L) para 7,0 e o precipitado foi removido por filtração através de algodão e o sobrenadante autoclavado (JOSHI et al., 2008). O pré-tratamento foi realizado com a finalidade de precipitar a proteína e hidrolisar a lactose, ficando mais prontamente utilizável para os microrganismos.

O meio de cultivo foi composto por 50 mL de resíduo e a adição de fontes de nitrogênio, indutores e micronutrientes foi realizada de acordo com o Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} , resolução IV, em dois blocos, apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Planejamento Fatorial Fracionário 2⁵⁻¹ utilizado para avaliação das variáveis significativas sobre a produção de biossurfactantes.

Trat.	Bloco	Tipo da Fonte de Nitrogênio	Conc. Fonte de Nitrogênio	Adição da Solução de Micronutrientes*	Tipo Indutor	Conc. Indutor
1	I	U (-1)	0,5% (-1)	N (-1)	OS (-1)	1% (-1)
2	I	SA (+1)	1,0% (+1)	N (-1)	OS (-1)	1% (-1)
3	I	U (-1)	0,5% (-1)	S (+1)	OS (-1)	2% (+1)
4	I	SA (+1)	1,0% (+1)	S (+1)	OS (-1)	2% (+1)
5	I	SA (+1)	0,5% (-1)	N (-1)	B (+1)	2% (+1)
6	I	U (-1)	1,0% (+1)	N (-1)	B (+1)	2% (+1)
7	I	SA (+1)	0,5% (-1)	S (+1)	B (+1)	1% (-1)
8	I	U (-1)	1,0% (+1)	S (+1)	B (+1)	1% (-1)
9	II	SA (+1)	0,5% (-1)	N (-1)	OS (-1)	2% (+1)
10	II	U (-1)	1,0% (+1)	N (-1)	OS (-1)	2% (+1)
11	II	SA (+1)	0,5% (-1)	S (+1)	OS (-1)	1% (-1)
12	II	U (-1)	1,0% (+1)	S (+1)	OS (-1)	1% (-1)
13	II	U (-1)	0,5% (-1)	N (-1)	B (+1)	1% (-1)
14	II	SA (+1)	1,0% (+1)	N (-1)	B (+1)	1% (-1)
15	II	U (-1)	0,5% (-1)	S (+1)	B (+1)	2% (+1)
16	II	SA (+1)	1,0% (+1)	S (+1)	B (+1)	2% (+1)

U: ureia; SA: sulfato de amônio; N: não; S: sim; OS: Óleo de Soja; B: Biodiesel. * A solução de micronutrientes será composta de Br: 0,026 g/L, Cu: 0,05 g/L, Mn: 0,05 g/L e Zn: 0,07 g/L, sendo adicionado 0,5 ml em 100 ml de meio (PRAVEESH et al., 2011).

O planejamento descrito na Tabela 1 foi realizado 4 vezes, com dois microrganismos e utilizando os dois resíduos (soro de leite e permeado da ultrafiltração do soro de leite).

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo para realização da fermentação. A inoculação foi realizada com adição de 2 mL de inóculo preparado na etapa anterior, apresentando densidade óptica maior ou igual a 1,0 a 660 nm. Os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 30 °C durante 5 d, sendo retiradas alíquotas no tempo inicial, 2 d e 5 d para a determinação da tensão superficial do meio e da concentração de biomassa.

Após a constatação dos tratamentos que mais diminuíram a tensão superficial do meio, tanto para soro de leite quanto para o permeado da ultrafiltração do soro de leite, repetiu-se a fermentação, durante 5 d, para verificar se o comportamento de produção dos agentes tensoativos se mantinha, avaliando-se os cultivos através das determinações diárias de tensão superficial e concentração de biomassa. Além disso, nos tempos inicial (0 d) e final (5 d) foram realizadas as determinações de atividade emulsificante água/óleo e óleo/água.

3.2.4 Precipitação dos biossurfactantes

Após o processo fermentativo, realizou-se a recuperação do biossurfactante de acordo com Dubey e Juwakar (2001). O caldo livre de células foi acidificado a pH 2 com HCl (1,0 mol/L), seguido por incubação durante 12 h a 4 °C e depois centrifugado a 5000 min⁻¹ durante 10 min. Após a precipitação realizou-se a liofilização (liofilizador marca Terroni) através da desidratação das amostras a frio sob vácuo, com acondicionamento a -70 °C até o momento do uso.

3.2.5 Identificação dos biossurfactantes produzidos

A identificação dos biossurfactantes produzidos para aplicação no ensaio de biorremediação foi realizada por espectrometria de massas no Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

A amostra foi preparada dissolvendo 2 µg do biossurfactante em uma solução de metanol/água (1:1 v/v). Para preparar a placa de MALDI, 1 µl do biossurfactante foi colocado sobre uma placa de 384 local (aço inoxidável polido) e seco à temperatura ambiente. A amostra seca foi então coberta com 1 µL de uma solução de matriz DHB (30 mg/mL em metanol). As análises foram realizadas por MALDI-MS num Bruker Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), que foi operada em modo refletor e equipado com um laser de *smart beam* 337 nm. Cada espectro foi adquirido com 700 *laser shots* em um único disparo. A região de m/z sobre a qual os íons foram detectados foi de 1000 a 1600 m/z no modo íon positivo. A faixa de potência do laser foi ajustada para 60% e as medições foram realizadas nas seguintes condições: fonte de íons 1 = 19,0 kV, fonte de íons 2 = 16,6 kV, tensão lente = 8,7 kV, tensão refletor 1 = 21,0 kV, tensão refletor 2 = 9,70 kV, delay de extração dos íons = 1.1 ns, supressão = 500 Da.

3.3 Ensaio de biorremediação do solo contaminado

Para a realização do experimento, foi utilizado um solo argiloso pertencente ao campus experimental de Geotecnia da Universidade de Passo Fundo, sendo este coletado a 1,2 metros de profundidade (horizonte B) em uma trincheira aberta. As amostras de solo foram coletadas em estado deformado.

O solo utilizado para a realização dos ensaios experimentais foi classificado pedologicamente como um Latossolo Vermelho Distrófico Húmico (STRECK et al. 2008). O mesmo é classificado geotecnicamente pela classificação unificada de solos como CH, ou argila de alta plasticidade. A caracterização geotécnica e física do solo está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização geotécnica e física do solo utilizado.

Parâmetro	Valor
Argila (%)	68,0
Silte (%)	5,0
Areia (%)	27,0
Limite de Liquidez (%)	53,0
Limite de Plasticidade (%)	42,0
Peso Real dos Grãos (kN/m ³)	26,7
Umidade Natural	34,0
Peso Específico Natural (kN/m ³)	16,3
Índice de Vazios	1,19
Grau de Saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54,0
pH	5,4
Matéria Orgânica (%)	< 0,8
Condutividade Hidráulica (cm/s)	1,39x10 ⁻³

Fonte: Prietto et al., 2010; Cecchin et al., 2016.

O solo apresenta pH ácido, alto teor de argila, baixo teor de matéria orgânica e baixa CTC, típica de solos com predominância do argilo-mineral caulinita (STRECK et al., 2008). Os solos argilosos possuem baixa permeabilidade, porém em Latossolos, que apresentam uma boa estruturação, a quantidade de macroporos é suficiente para que haja uma permeabilidade relativamente rápida de água e ar (REGINATTO, 2012).

O contaminante utilizado foi o biodiesel de soja puro (B100) adquirido junto à empresa BSBIOS, localizada na BR 285, km 294, Distrito industrial de Passo Fundo, RS.

Os ensaios de biorremediação de solo contaminado foram realizados em biorreatores hermeticamente fechados, com 300 g de solo, adicionado de 20% de biodiesel, e diferentes concentrações de biossurfactantes (0,1%, 0,5%, 1,0%) em relação à concentração de contaminante. A contaminação com 20% de biodiesel foi escolhida a fim de se realizar uma simulação de contaminação extensiva com este tipo de combustível, como por exemplo, as que ocorrem em acidentes viários, uma vez que a maior parte da distribuição do biodiesel ocorre via rede rodoviária. De acordo com Werneck e Rodrigues (2013), no ano de 2010,

100% do biodiesel foi transportado por rodovias, devido principalmente, à falta de oferta de outros modais que não o rodoviário no território nacional.

Os ensaios com adição de biossurfactantes foram comparados com ensaios de atenuação natural, por um período de 90 d.

Adicionalmente, foram realizados ensaios nas mesmas condições mencionadas anteriormente, mas com o solo esterilizado, a fim de investigar a influência da presença de biossurfactantes e ausência de microrganismos na redução/dessorção do contaminante. Os ensaios foram realizados em duplicata através do Delineamento Experimental apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Planejamento Experimental dos ensaios de biorremediação.

Trat.	Técnica de Biorremediação	Contaminante	Solo Esterilizado
1	Biossurfactante - 0,1%	Biodiesel	Não
2	Biossurfactante - 0,5%	Biodiesel	Não
3	Biossurfactante - 1,0%	Biodiesel	Não
4	Atenuação Natural	Biodiesel	Não
5	Controle	-	-
6	Biossurfactante - 0,1%	Biodiesel	Sim
7	Biossurfactante - 0,5%	Biodiesel	Sim
8	Biossurfactante - 1,0%	Biodiesel	Sim
9	Atenuação Natural	Biodiesel	Sim

3.4 Determinações analíticas

3.4.1 Determinação da tensão superficial do meio

A tensão superficial dos meios foi realizada na ausência de células de acordo com o método do anel (Du-Nuoy's ring method), utilizando medidor de tensão superficial, marca Sigma, modelo 702, no tempo inicial, 2 d e 5 d de cultivo.

Foram determinados valores adimensionais de tensão superficial (RTS), calculados pela razão entre tensão superficial inicial e tensão superficial final, para os quatro primeiros planejamentos. Assim, valores de $RTS > 1$ indicam que houve redução da tensão superficial e $RTS < 1$ que houve aumento da tensão superficial, sendo que este último não é de interesse do referido estudo. Os valores de RTS foram tabelados e graficados e posteriormente analisados

através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para comparação dos tratamentos, sendo utilizado o software Statistica 8.0 (STATSOFT, 1999).

3.4.2 Determinação da concentração da biomassa seca durante a produção de biossurfactantes

A avaliação do crescimento dos microrganismos foi realizada pela determinação da concentração de biomassa no tempo inicial, 2 d e 5 d. Foram centrifugados 13 mL dos cultivos em centrífuga (CT 5000 R), o sobrenadante foi removido e a biomassa foi adicionada em capsulas de alumínio previamente taradas em estufa a 60 °C por 24 h. Através da Equação 1, obteve-se a concentração da biomassa seca durante os cultivos.

$$\text{Conc. de biomassa seca (mg/mL)} = \frac{(\text{cápsula+biomassa seca}) - (\text{cápsula})}{\text{volume}} \quad (1)$$

Após foram determinados valores adimensionais de concentração de biomassa (RCB), calculados pela razão entre concentração de biomassa final e concentração de biomassa inicial, para os quatro primeiros planejamentos, sendo que $RCB > 1$, indica que houve crescimento microbiano.

3.4.3 Determinação da atividade emulsificante

A determinação da atividade emulsificante foi realizada no meio livre de células, após a centrifugação, no tempo inicial e final dos tratamentos que tiveram a maior redução da tensão superficial. As atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) foram determinadas segundo metodologia proposta por Martins et al. (2006) com modificações em relação ao óleo utilizado. Foram utilizados 3,5 mL de extrato obtido do processo fermentativo e 2 mL de biodiesel. A mistura foi agitada em agitador Vórtex a 700 rpm por 1 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado O/A em espectrofotômetro a 610 nm. A absorbância da atividade emulsificante O/A foi obtida diminuindo-se a absorbância da amostra da absorbância do branco conforme a Equação 2. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura em paquímetro, da altura da emulsão A/O formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo), gerando a atividade emulsificante A/O de acordo com a Equação 3. Três brancos foram realizados, utilizando extrato no lugar da amostra.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \quad (2)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (3)$$

Em que:

$AE_{O/A}$: atividade emulsificante óleo/água (UE);

$AE_{A/O}$: atividade emulsificante água/óleo (UE);

ABS: absorvância;

E: relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total;

3.4.4 Determinação do teor de umidade

As determinações de umidade dos ensaios de biorremediação em solo foram realizadas no tempo inicial, 30 d, 60 d, 45d e 90 d, através da Equação 4, segundo NBR 6457 (ABNT, 1986).

$$Umidade(\%) = \frac{(cápsula+soloúmido)-(cápsula+solo seco)}{(cápsula +solo seco)-(cápsula)} .100 \quad (4)$$

Os valores obtidos nas análises de umidade foram utilizados para realização do cálculo da remoção do contaminante, pois o mesmo foi realizado com relação ao solo seco.

3.4.5 Determinação do CO₂ liberado

Para avaliação da produção de CO₂ nos ensaios de biorremediação, foi utilizado a metodologia de respirometria, adaptado do método respirométrico de Bartha descrito pela NBR – 14.283. A mensuração da geração de CO₂ foi realizada somente nos ensaios em que o solo utilizado não foi esterilizado.

O volume da solução de HCl, gasto para atingir o pH capaz de mudar a coloração do indicador fenolftaleína da cor rósea para a incolor, foi utilizado no cálculo da quantidade de CO₂ produzido, comparando-se com o volume gasto para titular o branco (NaOH sem presença de solo no interior do frasco). Este cálculo é possível, pois o CO₂ resultante da biodegradação reage com o NaOH, no interior do frasco, formando Na₂CO₃. Quando a mistura de Na₂CO₃ e excesso de NaOH é adicionada à solução de BaCl₂ ocorre reação do Na₂CO₃ e do BaCl₂ formando o precipitado BaCO₃, sequestrando o carbonato e garantindo

que o HCl reaja apenas com o NaOH excedente (Equação 5 e 6), permitindo o cálculo da quantidade de CO₂ produzida (COSTA, 2005).

Nos frascos contendo os solos contaminados foi colocado um béquer de 50 mL com 30 mL de solução de NaOH (0,5 mol/L). A cada 2 dias foi retirado o béquer contendo NaOH, dos quais foram retirada uma alíquota de 10 mL para um erlenmeyer (125 mL), ao qual foi adicionado 10 mL de BaCl₂ (0,2 mol/L) e 2 gotas de indicador fenolftaleína. Esse precipitado foi titulado com HCl padronizado (0,1 mol/L) para cálculo da liberação de CO₂ (determinações foram feitas em duplicata). Após, lavou-se o béquer com água destilada e adicionou-se o NaOH (30 mL), para novas determinações.



Com o volume de HCl gasto na titulação foi possível saber, por estequiometria, a quantidade de CO₂ gerada pelos microrganismos do solo em cada um dos tempos determinados, conforme Equação 7.

$$C - CO_{2(mg)} = (B - V) \cdot M \cdot f \cdot 6 \cdot (V_1 \cdot V_2) \quad (7)$$

Em que:

B= Volume de HCl gasto no branco (mL);

V = Volume de HCl gasto na amostra (mol/L);

M = Concentração real do HCl (mol/L);

6 = Massa atômica do C(12) dividido pelo número de mols de CO₂ que reagem com o NaOH

V1 = Volume de NaOH usado na captura de CO₂ (mL);

V2 = Volume de NaOH usado na titulação (mL);

F = fator de correção do HCl;

Como foram retiradas amostras de solo para a análise de óleos e graxas ao longo do tempo, o cálculo da liberação de CO₂ sempre foi corrigido para a massa de 1 kg de solo.

Os dados foram tabelados e graficados e posteriormente analisados através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 95% (p < 0,05), para comparação dos tratamentos, sendo utilizado o software Statistica 8.0 (STATSOFT, 1999).

3.4.6 Análise de óleos e graxas

A análise de óleos e graxas foi realizada para determinar a remoção do contaminante pelos microrganismos presentes no solo, nos tempos inicial, 30 d, 45 d, 60 d, e 90 d.

A análise gravimétrica de óleos e graxas foi realizada seguindo a metodologia de extração por ultrassom da USEPA 3550B (1996). O ultrassom auxilia na remoção de substâncias voláteis e semi-voláteis do solo, podendo esta ser quantificada. O cálculo do teor residual e do percentual de degradação foi calculado através da Equação 8.

$$\text{Teor residual (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \cdot 100 \quad (8)$$

Em que:

P_0 : Quantidade de amostra de solo em peso seco utilizada na análise (g)

P_1 : Peso do balão de fundo chato (g)

P_2 : Peso do balão de fundo chato mais a mistura B100 extraída do solo contaminado (g)

O resultado foi obtido em base seca, sendo que para obtenção do resultado na forma de remoção foi utilizada a Equação 9.

$$\text{Remoção(\%)} = \frac{OG_{inicial} - OG_{final}}{OG_{inicial}} \cdot 100 \quad (9)$$

Em que:

$OG_{inicial}$: concentração inicial de óleos e graxas

OG_{final} : concentração final de óleos e graxas

Os dados foram tabelados e graficados e posteriormente analisados através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), para comparação dos tratamentos, sendo utilizado o software Statistica 8.0 (STATSOFT, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos nesta pesquisa bem como as discussões pertinentes aos mesmos. O capítulo está dividido em duas partes: produção de biossurfactantes a partir de soro de leite e do permeado da ultrafiltração de soro de leite e o uso dos biossurfactantes produzidos em ensaio de biorremediação, sendo inicialmente apresentado os resultados de caracterização dos resíduos e de identificação dos microrganismos produtores de biossurfactantes.

4.1 Caracterização dos resíduos

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises realizadas no soro de leite e no permeado da ultrafiltração do soro de leite, para verificação das características de cada um dos resíduos. As principais diferenças nos valores obtidos para os seis parâmetros analisados estão nos teores de sais, proteínas e sólidos totais, isso se deve ao fato que na ultrafiltração os solutos de maior peso molecular são retidos na membrana.

Tabela 4 – Caracterização do soro de leite e do permeado da ultrafiltração do soro de leite.

Análises/Resíduos	<i>Soro de Leite</i>	<i>Permeado da Ultrafiltração do Soro de Leite</i>
<i>Sais (g/100g)</i>	0,51	0,19
<i>Gordura (g/100g)</i>	0,14	0,06
<i>Proteína (g/100g)</i>	0,61	0,17
<i>Lactose (g/100g)</i>	4,21	4,21
<i>Sólidos Totais (g/100g)</i>	5,48	5,11
<i>Umidade (g/100g)</i>	94,52	94,90

Devido a sua rica composição o soro de leite é um ótimo substrato para a fermentação industrial e tem contribuído para bom crescimento microbiano. O soro de leite pode ser utilizado em processos fermentativos de produção de bioprodutos com elevado valor agregado, tais como bioemulsificantes (SPALATELU, 2012).

Segundo Fox e Bala (2000) os resíduos de soro de leite são considerados como substratos viáveis para a produção de biossurfactantes, em substituição as fontes tradicionais,

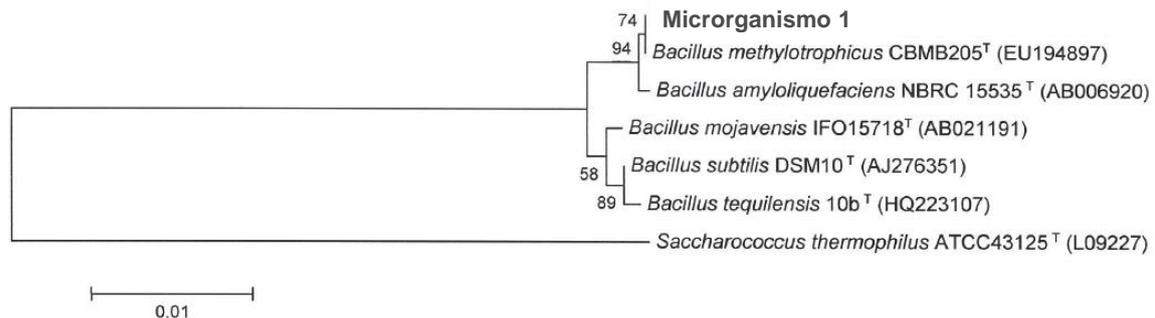
no entanto para utilizar eficazmente a lactose, o microrganismo escolhido deve ser capaz de metabolizar a lactose e seus produtos de degradação, glicose e galactose.

4.2 Identificação dos microrganismos produtores de biossurfactantes

A análise microscópica revelou que se tratam de duas bactérias, na forma de bastonetes, com coloração Gram positiva.

Para o Microrganismo 1 a árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra está apresentada na Figura 2.

Figura 2 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra do Microrganismo 1 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.



A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S obtida para a amostra do Microrganismo 1 está apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Sequência parcial do RNA ribossomal 16S da amostra analisada.

```

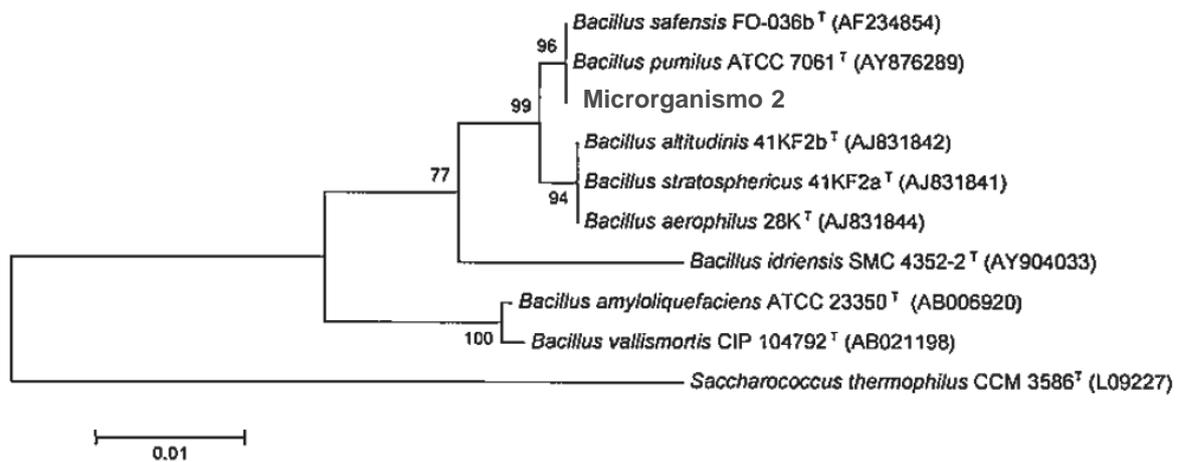
CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAACCCTGGGAAACCCTGGGCTAA
TACCGGATGGTTGTYTGAACCGCATGGTTTACAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACCGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACGAAAGCCACGGCTAACCTACGTTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAGTGGGGTTTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAA
GCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGG
TGC
  
```

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S do Microrganismo 1 apresentou 100% de similaridade com sequências de RNA ribossomal de várias linhagens de *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus amyloliquefaciens*, além de vários isolados de *Bacillus* sp.,

contidas na base de dados consultadas do GenBank e RDP. A análise filogenética (Figura 2) apresentou o Microrganismo 1 em um agrupamento juntamente com a linhagem tipo de *Bacillus methylotrophicus*, confirmando os resultados da busca nas bases de dados e definindo a identificação do Microrganismo 1 em nível de espécie.

Para o Microrganismo 2 a árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra está apresentada na Figura 4.

Figura 4 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra do Microrganismo 2 e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.



A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S obtida para a amostra do Microrganismo 2 está apresentada na Figura 5.

Figura 5 – Sequência parcial do RNA ribossomal 16S da amostra analisada.

```
CAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGGACGGGGTGAAGTAAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACCTTACAGATGGACCCGCGCGC
ATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTT
TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCCACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGCTCTG
```

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S do Microrganismo 2 apresentou 100% de similaridade com sequências de RNA ribossomal de várias linhagens de *Bacillus*

pumilus e *Bacillus safensis*, contidas na base de dados consultadas do GenBank e RDP. A análise filogenética (Figura 4) recuperou o Microrganismo 2 em um agrupamento coeso, suportado por alto valor de re-amostragem (96%), juntamente com as linhagens tipo de *Bacillus pumilus* e *Bacillus safensis*, confirmando os resultados de busca na base de dados. Neste caso o gene RNA ribossomal 16S não ofereceu resolução para discriminar essas espécies de *Bacillus*, as quais são filogeneticamente muito próximas entre si e idênticas em nível de RNAr 16S. Estas bactérias são gram-positivas, anaeróbicas facultativas e pertencem a família Bacillaceae. Estas espécies apresentam características genotípicas muito semelhantes e podem ser diferenciadas através de propriedades bioquímicas ou genes marcadores específicos, como o gene da DNA girasse.

O Quadro 2 apresenta o resultado da identificação dos Microrganismos 1 e 2.

Quadro 2 – Resultado da identificação do Microrganismo 1 e 2.

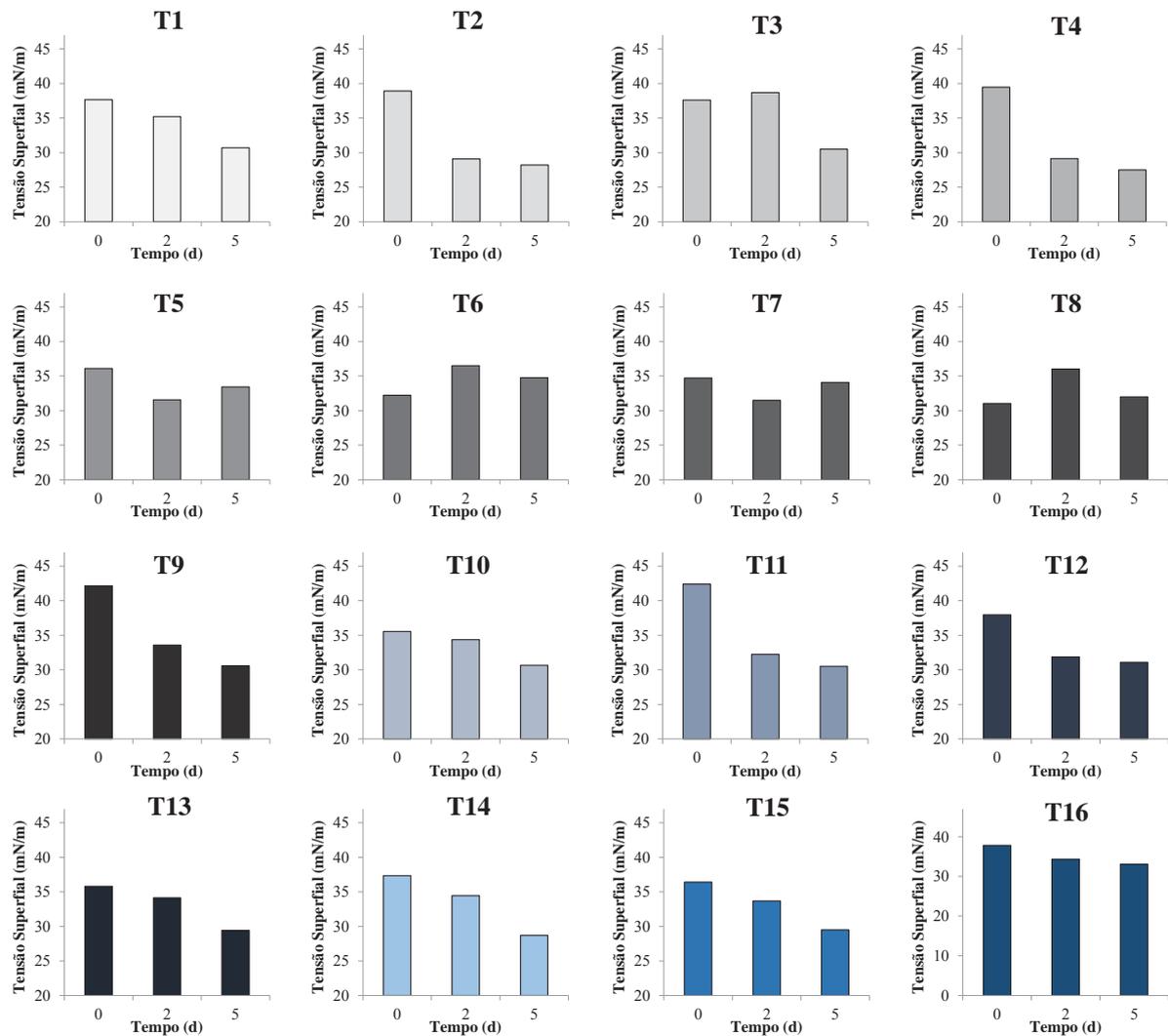
Amostra	Identificação
Microrganismo 1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> , Madhaiyan et al., 2010
Microrganismo 2	<i>Bacillus</i> sp., Cohn, 1872

4.3 Produção de biossurfactantes

4.3.1 Experimentos utilizando soro de leite como componente do meio de cultivo

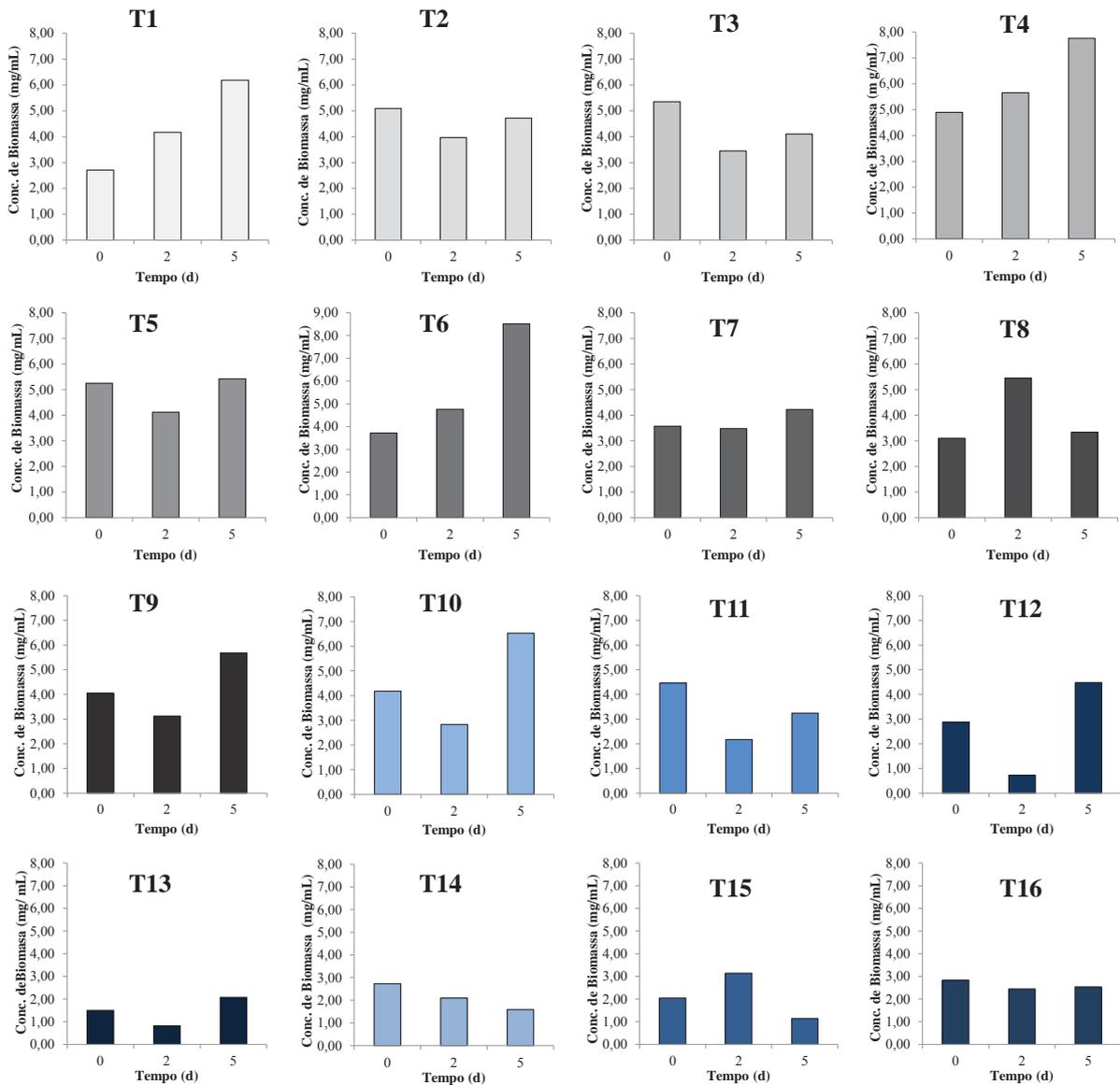
As Figuras 6, 7, 8 e 9 apresentam os resultados das medidas de tensão superficial e concentração de biomassa das fermentações com soro de leite para a *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*, para os experimentos dos Planejamentos Experimentais realizados.

Figura 6 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*, a partir de soro de leite.



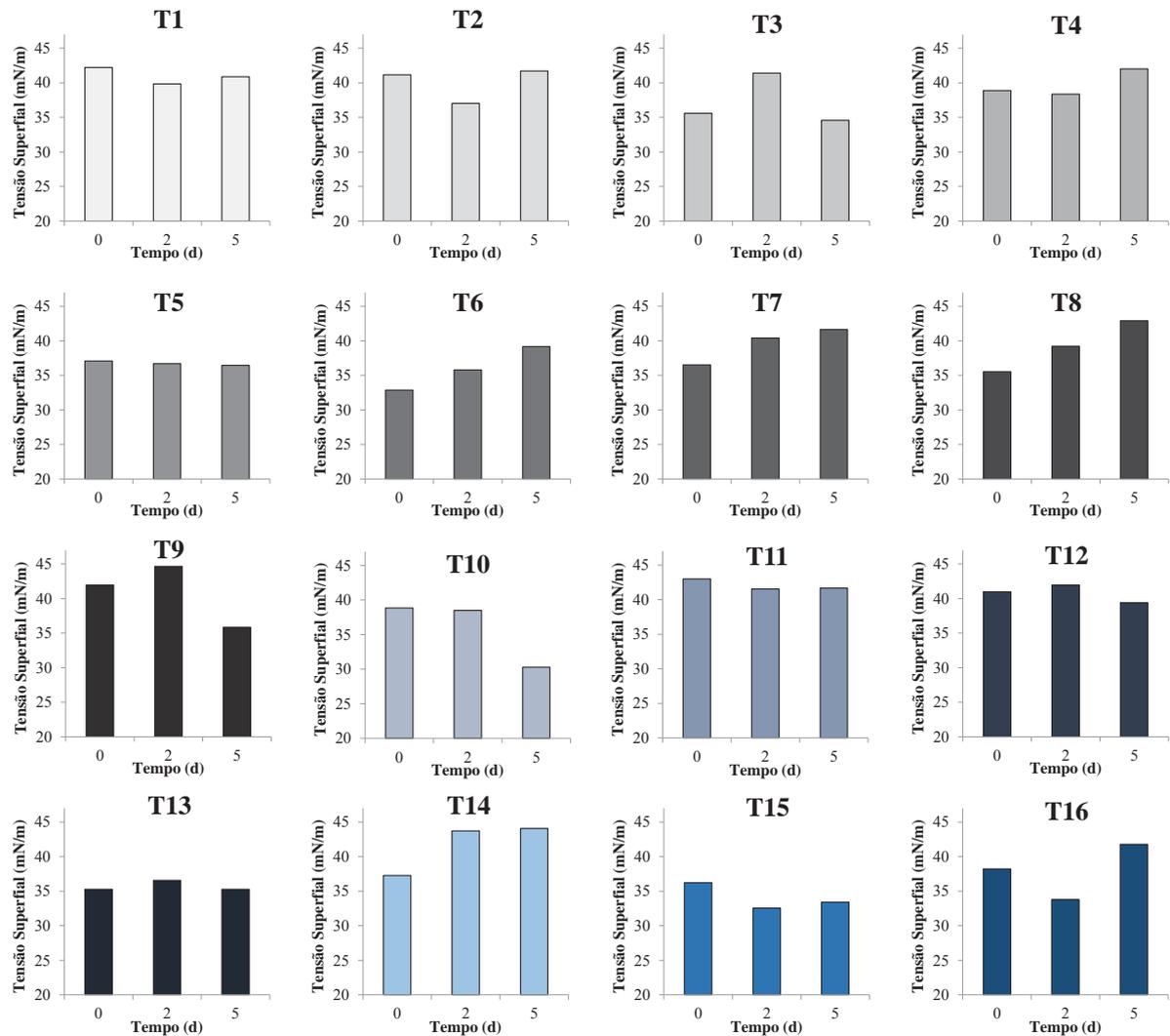
T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Figura 7 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*, a partir de soro de leite.



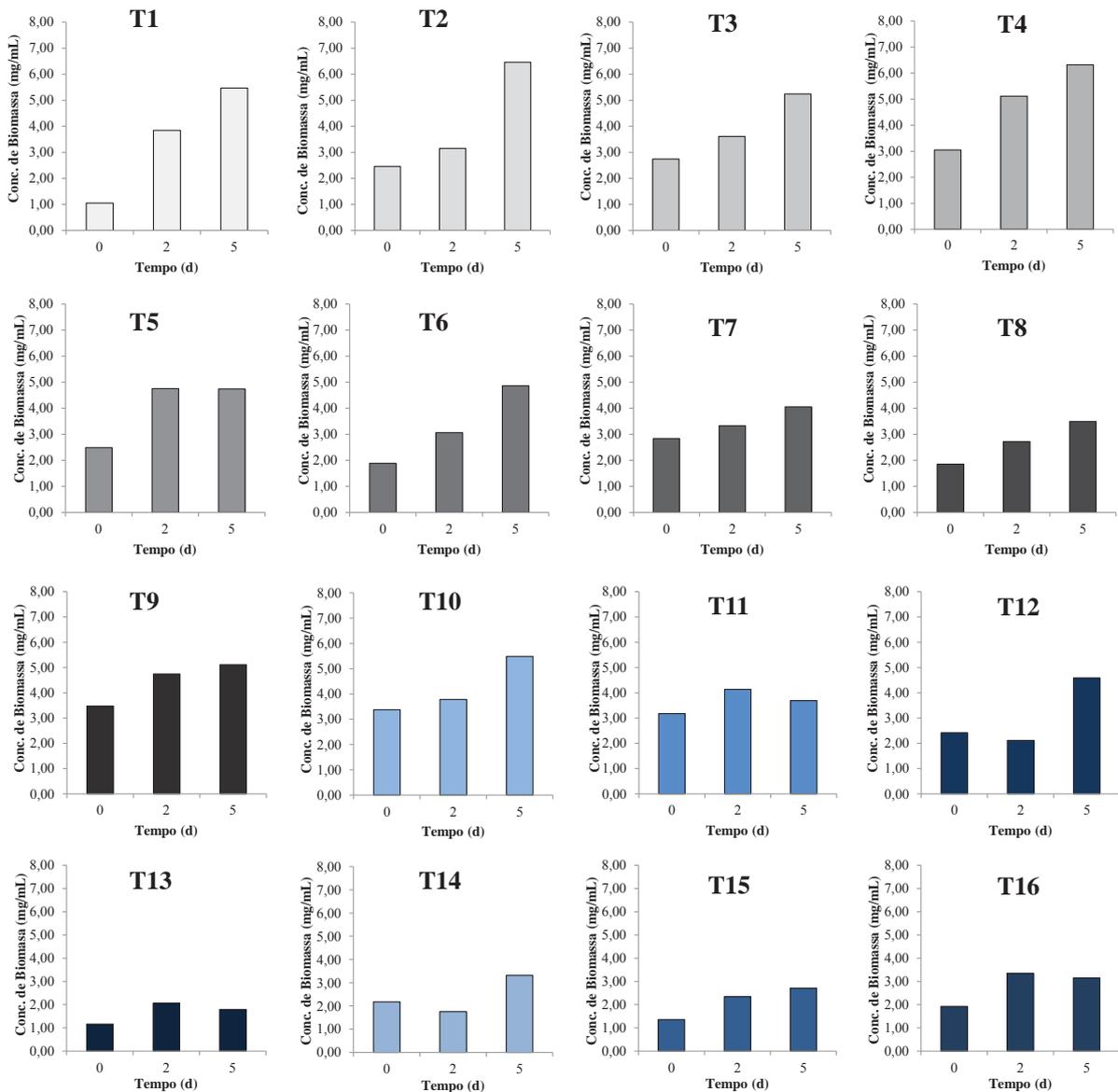
T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Figura 8 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus pumilus*, a partir de soro de leite.



T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Figura 9 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus pumilus*, a partir de soro de leite.



T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Avaliando os resultados para *Bacillus methylotrophicus* (Figura 6) pode-se observar que exceto os tratamentos T6 e T8, os demais apresentaram decréscimo da tensão superficial

no decorrer do tempo de fermentação, indicando produção de compostos tensoativos no meio de cultivo, sendo que o tratamento que apresentou menor tensão superficial após 5 d de cultivo foi o T4, onde a tensão superficial obtida foi de 27,51 mN/m, sendo considerada baixa (DUBEY et al, 2012). Na maior parte dos tratamentos foi observado crescimento microbiano (Figura 7). O tratamento que teve o maior concentração de biomassa foi o T6, 8,52 mg/mL, após 5 d de fermentação.

Na fermentação com *Bacillus pumilus* na maioria dos tratamentos também houve redução da tensão superficial no decorrer do tempo (Figura 8), no entanto a diminuição não foi acentuada. O tratamento que apresentou a menor tensão superficial foi o T10, de 30,29 mN/m. Em todos os tratamentos houve aumento da concentração de biomassa, sendo que o tratamento com maior aumento foi T1 (5,48 mg/mL) (Figura 9). Observa-se ainda grande variação nos valores de tensão superficial no tempo inicial, isso se deve as diferentes composições do meio de cultivo.

As relações entre as tensões superficiais, inicial e final (RTS) e as concentrações de biomassa final e inicial (RCB) estão apresentadas na Tabela 5. Quanto maior for o fator, maior a redução da tensão superficial e maior o crescimento microbiano, indicando maior produção de biossurfactantes.

O maior valor obtido de RTS para fermentação com *Bacillus methylotrophicus* (1,43) foi para o T4, já na fermentação com *Bacillus pumilus* o maior valor obtido (1,28) foi para o T10. Para a concentração de biomassa, os maiores valores obtidos de RCB para fermentação com *Bacillus methylotrophicus* foram para o T6 (2,29) e T1 (2,28). Quanto à fermentação com *Bacillus pumilus* o maior valor obtido (5,21) foi para o T1, sendo estes os tratamentos onde houve o maior crescimento microbiano.

Tabela 5 – Relação entre a tensão superficial inicial e final e entre a concentração de biomassa final e inicial para *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*.

Tratamento	<i>Bacillus methylotrophicus</i>		<i>Bacillus pumilus</i>	
	RTS	RCB	RTS	RCB
T1	1,23±0,002	2,28±0,01	1,03±0,005	5,21±0,17
T2	1,38±0,003	0,93±0,03	0,99±0,000	2,63±0,01
T3	1,23±0,002	0,77±0,02	1,03±0,005	1,91±0,09
T4	1,43±0,005	1,58±0,02	0,93±0,007	2,07±0,01
T5	1,08±0,001	1,03±0,01	1,02±0,001	1,91±0,02
T6	0,93±0,001	2,29±0,00	0,84±0,001	2,59±0,17
T7	1,02±0,002	1,18±0,02	0,88±0,000	1,43±0,13
T8	0,97±0,000	1,07±0,00	0,83±0,002	1,89±0,14
T9	1,38±0,014	1,41±0,03	1,17±0,007	1,47±0,00
T10	1,16±0,019	1,56±0,02	1,28±0,013	1,62±0,03
T11	1,39±0,010	0,73±0,01	1,03±0,008	1,16±0,12
T12	1,22±0,003	1,56±0,09	1,04±0,011	1,89±0,01
T13	1,22±0,011	1,40±0,20	1,00±0,016	1,55±0,06
T14	1,30±0,002	0,58±0,03	0,85±0,003	1,53±0,09
T15	1,23±0,022	0,56±0,03	1,08±0,024	2,00±0,14
T16	1,14±0,005	0,89±0,07	0,92±0,018	1,64±0,17

* Resultados de média ± desvio padrão; RTS: Relação entre a tensão superficial inicial e final; RCB: Relação entre a biomassa final e inicial;

Levando em consideração a redução da tensão superficial nos 16 tratamentos pode-se observar que o maior crescimento dos microrganismos não indicou maior redução da tensão superficial, pois os tratamentos em que se obteve maior redução da tensão superficial foram T4 e T10, para *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*, respectivamente, não sendo estes os tratamentos com maior crescimento microbiano.

Para melhor entendimento da influência das variáveis sobre a tensão superficial realizou-se análise de variância dos resultados através do módulo Experimental Design do Software Statistica 8.0, utilizando os valores referentes à relação da tensão superficial inicial e final. Para a concentração da biomassa não se realizou a análise de variância dos resultados por não ser esse o produto de interesse, mas sim a tensão superficial, sendo que este parâmetro foi analisado para verificar se haveria relação entre o crescimento microbiano e a redução da tensão superficial.

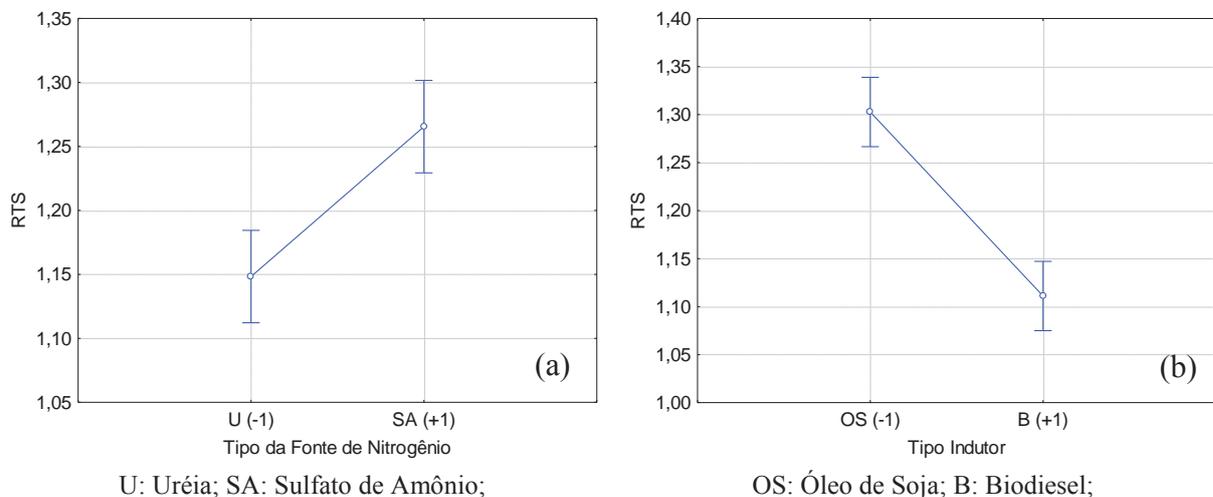
A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas, (fonte de nitrogênio, concentração da fonte de nitrogênio, adição da solução de micronutrientes, tipo de indutor e concentração de indutor), sobre a tensão superficial, para fermentação com *Bacillus methylotrophicus*. As variáveis significativas ($p < 0,05$) na redução da tensão superficial foram o tipo da fonte de nitrogênio e o tipo de indutor. A maior redução da tensão superficial foi observada para o nível +1 da variável tipo da fonte de nitrogênio, ou seja, o efeito principal

foi positivo, na presença de sulfato de amônio (Figura 10a). Já para a variável tipo de indutor, a maior redução da tensão superficial foi observada no nível -1, com efeito principal negativo, na presença de óleo de soja (Figura 10b).

Tabela 6 – Efeitos estimados das variáveis para *Bacillus methylotrophicus*, para fermentação submersa com soro de leite.

Fonte de Variação	Efeitos Estimados p (nível de significância)	
Média	1,2069	0,0000
Blocos	0,0970	0,0004
(1) Tipo da Fonte de Nitrogênio	0,1172	0,0000
(2) Conc. da Fonte de Nitrogênio	-0,0304	0,2363
(3) Adição Solução de Micronutrientes	-0,0033	0,8963
(4) Tipo de Indutor	-0,1916	0,0000
(5) Concentração de Indutor	-0,0169	0,5068

Figura 10 – Efeito do tipo da fonte de nitrogênio (a) e do tipo de indutor (b) na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*, a partir de soro de leite.



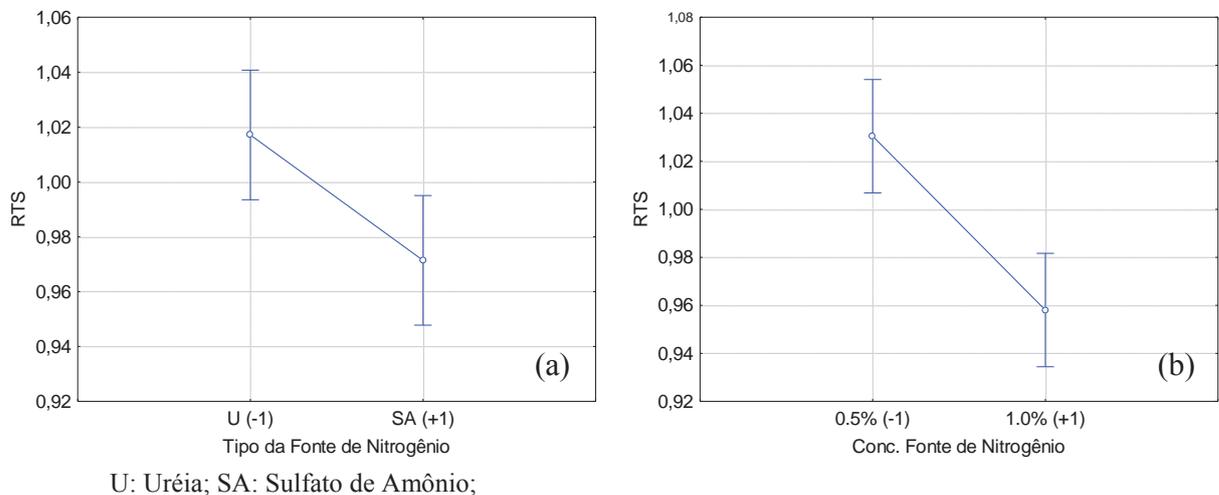
A Tabela 7 apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas, (fonte de nitrogênio, concentração da fonte de nitrogênio, adição da solução de micronutrientes, tipo de indutor e concentração de indutor) sobre a tensão superficial, para fermentação com *Bacillus pumilus*. Todas as variáveis foram significativas para a redução da tensão superficial. Para as variáveis: tipo da fonte de nitrogênio (Figura 11a), concentração da fonte de nitrogênio (Figura 11b), adição da solução de micronutrientes (Figura 11c) e tipo de indutor (Figura 11d), a maior redução da tensão superficial ocorreu no nível -1, ou seja, os melhores resultados foram obtidos quando utilizada com a ureia como fonte de nitrogênio, na

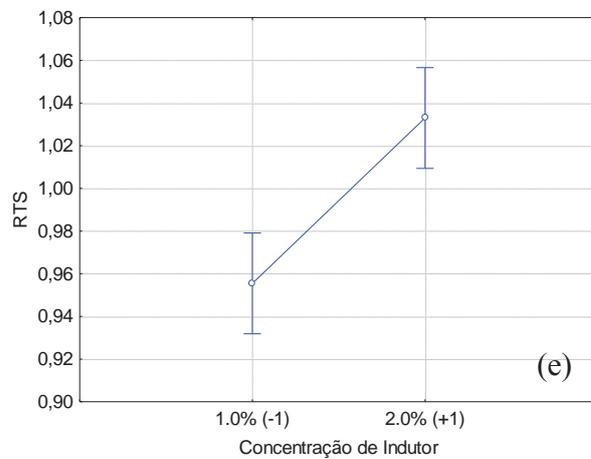
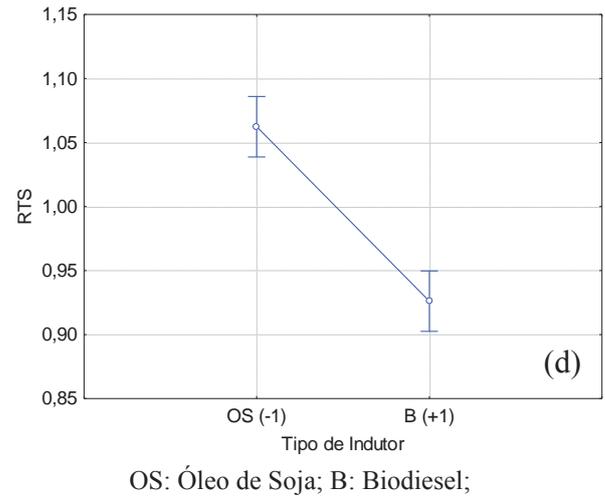
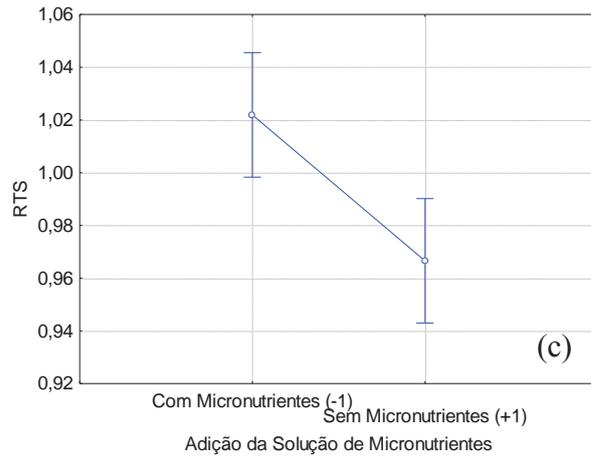
concentração de 0,5%, sem a adição da solução de micronutrientes e com óleo de soja como indutor. Já para a variável concentração de indutor no nível +1, o efeito principal foi positivo, isto é na concentração de 1% (Figura 11e).

Tabela 7 – Efeitos estimados das variáveis para fermentação com *Bacillus pumilus*, para fermentação submersa com soro de leite.

Fonte de Variação	Efeitos Estimados	p (nível de significância)
Média	0,9942	0,0000
Blocos	0,1042	0,0000
(1) Tipo da Fonte de Nitrogênio	-0,0457	0,0085
(2) Conc. da Fonte de Nitrogênio	-0,0724	0,0001
(3) Adição Solução de Micronutrientes	-0,0554	0,0018
(4) Tipo de Indutor	-0,1362	0,0000
(5) Concentração de Indutor	0,0775	0,0000

Figura 11 - Efeito da fonte de nitrogênio (a), da concentração da fonte de nitrogênio (b), da adição da solução de micronutrientes (c), do tipo de indutor (d) e da concentração de indutor (e) na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com *Bacillus pumilus*, a partir de soro de leite.

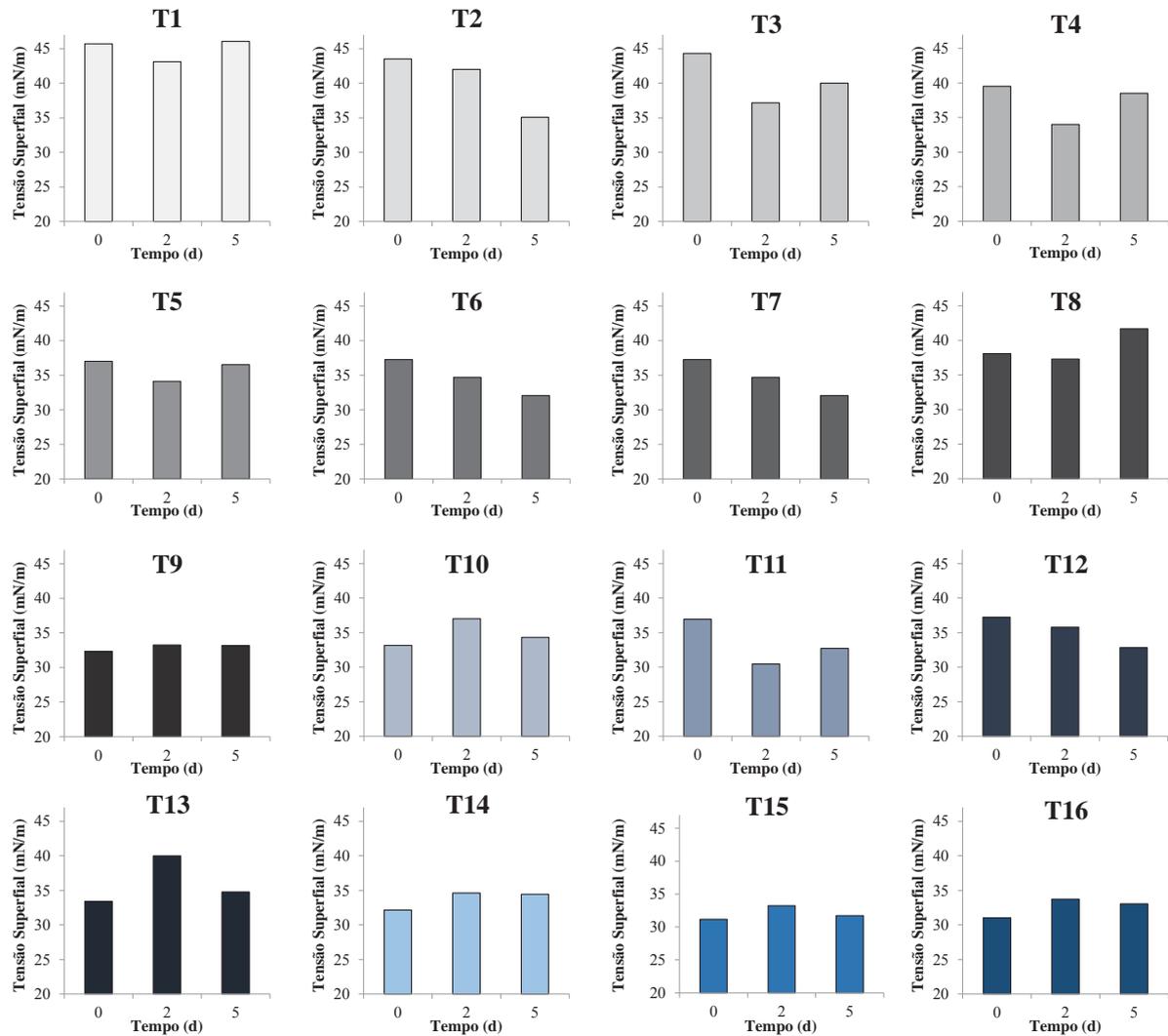




4.3.2 Experimentos utilizando permeado da ultrafiltração do soro de leite como componente do meio de cultivo

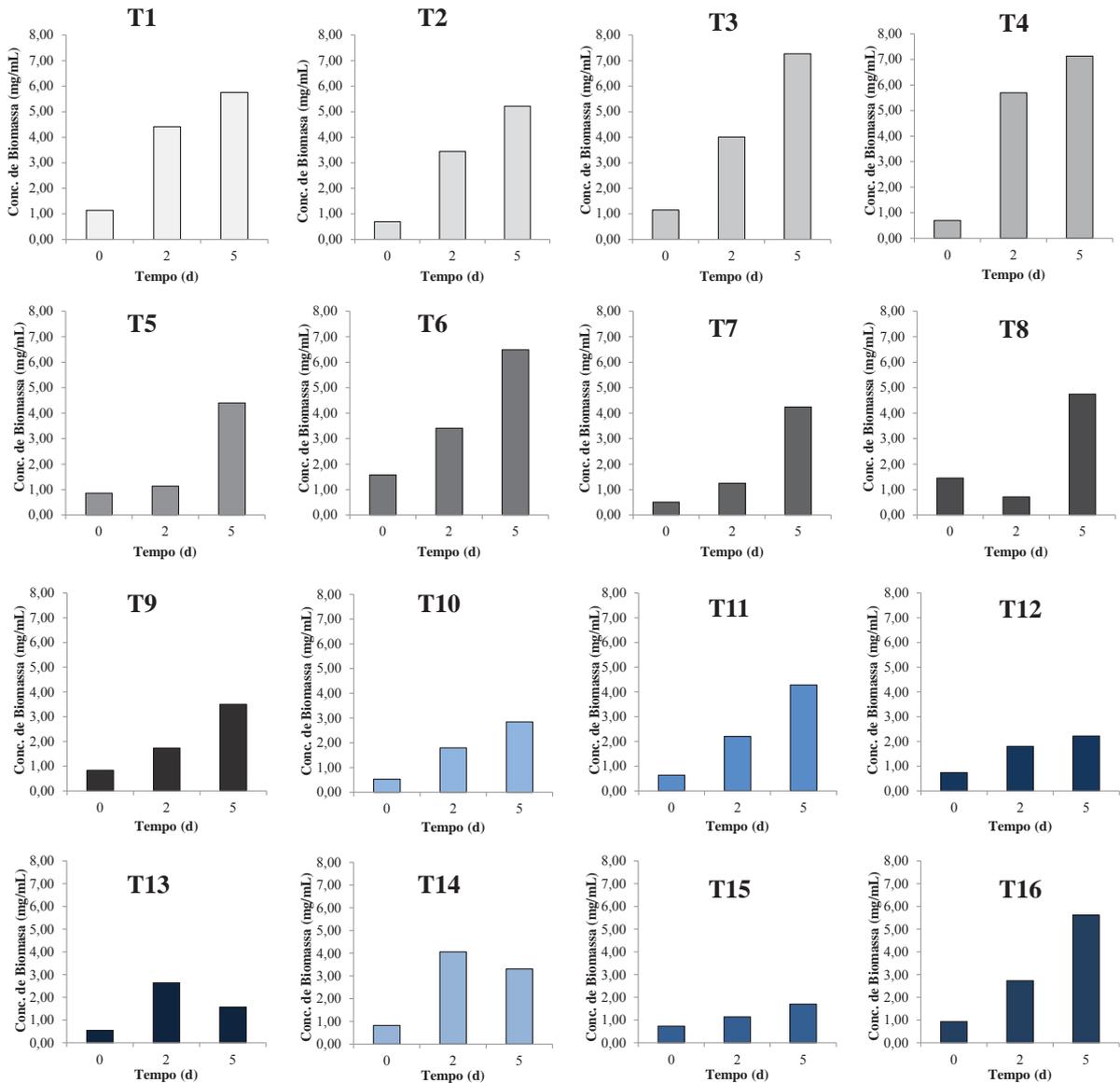
As Figuras 12, 13, 14 e 15 apresentam os resultados das medidas de tensão superficial e concentração de biomassa das fermentações com permeado da ultrafiltração de soro de leite para *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*, para os experimentos dos Planejamentos Experimentais realizados.

Figura 12 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*, a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.



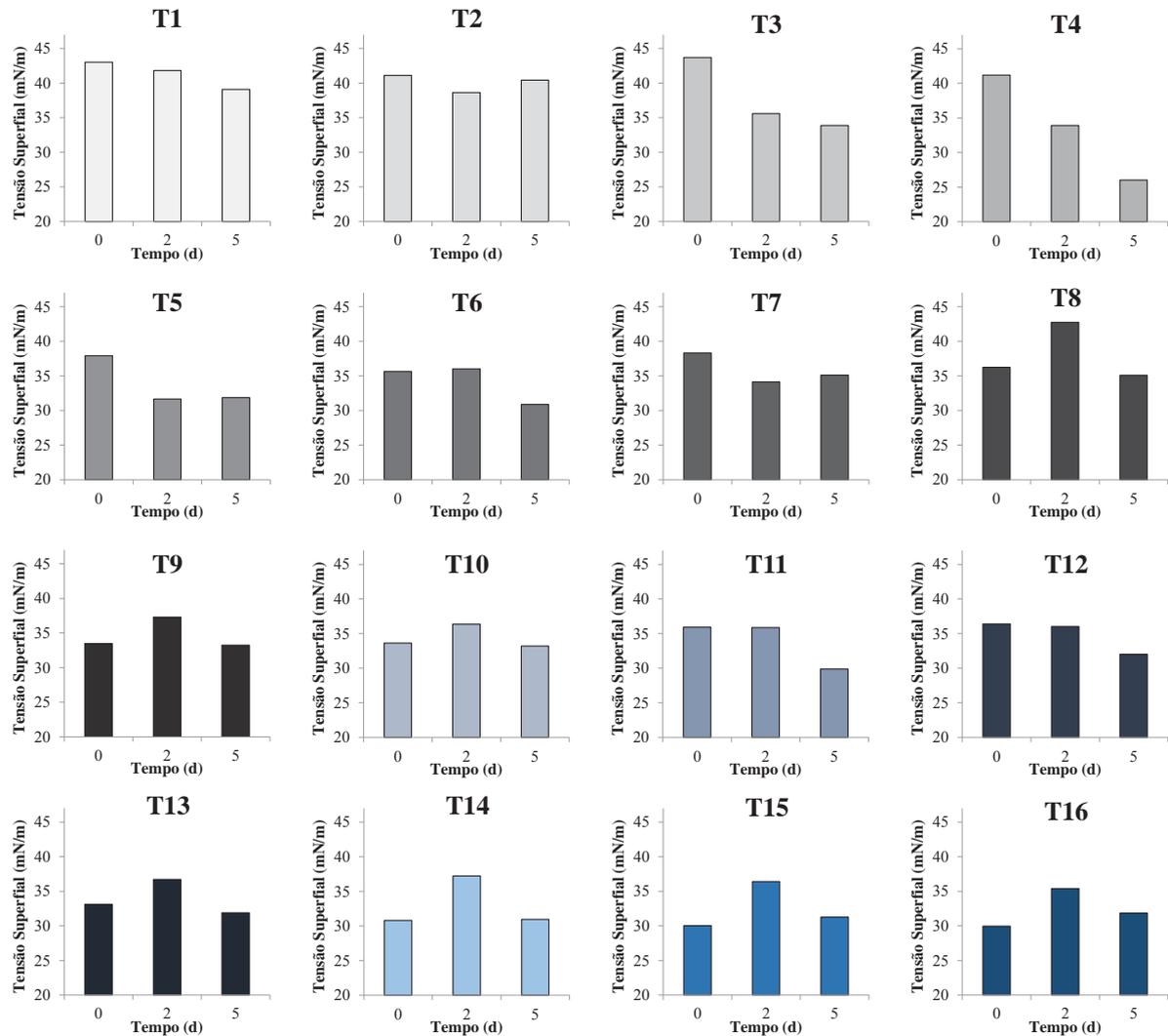
T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Figura 13 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*, a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.



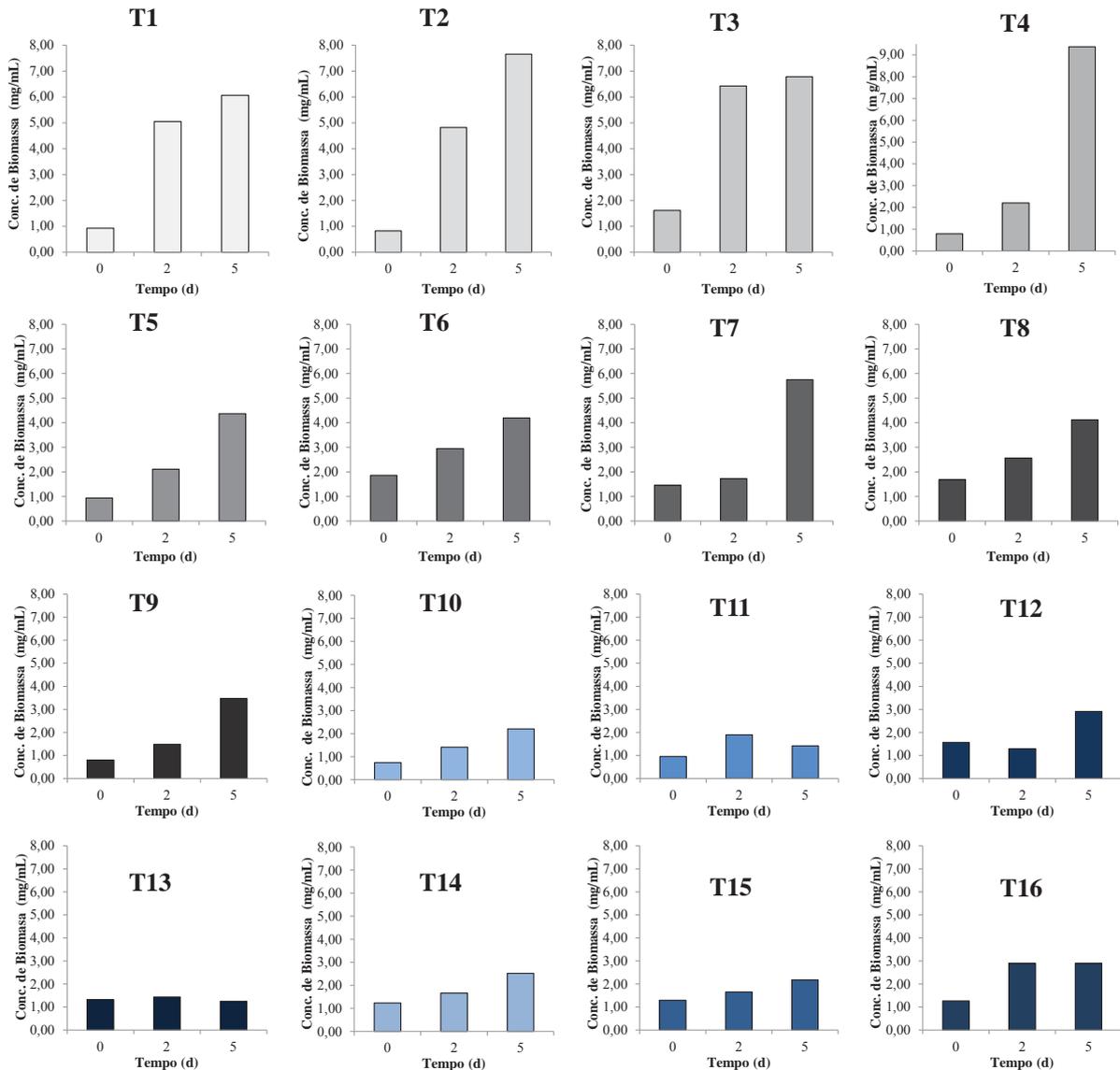
T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Figura 14 – Medidas de tensão superficial obtida nos meios livres de células durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus pumilus*, a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.



T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Figura 15 – Concentração de biomassa obtida durante a fermentação submersa, para a produção de biossurfactantes com *Bacillus pumilus*, a partir de permeado da ultrafiltração de soro de leite.



T1: ureia, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T2:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T3:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T4:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T5:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T6:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T7:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T8:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T9:** sulfato de amônio, 0,5%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T10:** ureia, 1,0%, sem micronutrientes, óleo de soja, 2,0%; **T11:** sulfato de amônio, 0,5%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T12:** ureia, 1,0%, com micronutrientes, óleo de soja, 1,0%; **T13:** ureia, 0,5%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T14:** sulfato de amônio, 1,0%, sem micronutrientes, biodiesel, 1,0%; **T15:** ureia, 0,5%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%; **T16:** sulfato de amônio, 1,0%, com micronutrientes, biodiesel, 2,0%.

Avaliando os resultados para *Bacillus methylotrophicus* pode-se observar que na maior parte dos tratamentos houve diminuição da tensão superficial no tempo 2 d (Figura 12), no entanto com o avanço do período de fermentação houve aumento, sendo que nos tratamentos em que houve diminuição, a mesma é considerada pequena, o que indica a pequena produção de compostos tensoativos no meio de cultivo. O tratamento que apresentou a menor redução da tensão superficial em 5 d de cultivo foi o T2, onde a tensão superficial obtida foi de 35,07 mN/m. Quanto a concentração de biomassa no decorrer do tempo de fermentação, todos os tratamentos tiveram aumento (Figura 13), indicando que houve crescimento microbiano, sendo que o tratamento em que se obteve a maior concentração foi o T4, onde a concentração de biomassa obtida foi 7,13 mg/mL.

Para a fermentação com *Bacillus pumilus*, na maior parte dos tratamentos houve redução da tensão superficial no decorrer do tempo, sendo que o tratamento que apresentou a menor tensão superficial foi T4, onde a tensão superficial obtida foi de 26,02 mN/m (Figura 14), considerada baixa (DUBEY et al, 2012), o que indica a produção de biossurfactantes no meio de cultivo. Com relação a concentração de biomassa, todos os tratamentos tiveram aumento no decorrer do tempo de fermentação, exceto o T13, indicando que houve o crescimento microbiano. O maior valor foi para o T4, onde a concentração de 9,37 mg/mL (Figura 15).

As relações entre as tensões superficiais inicial e final (RTS) e concentração de biomassa final e inicial estão apresentado na Tabela 8. O maior valor obtido de RTS para fermentação com *Bacillus methylotrophicus* (1,24) foi para o T2, já na fermentação com *Bacillus pumilus*, o maior valor obtido (1,58) foi para o T4, sendo estes os tratamentos onde houve maior redução da tensão superficial. Para a relação da concentração da biomassa para os dois microrganismos, o maior valor obtido de RCB durante a fermentação foi com o T4, sendo que para *Bacillus methylotrophicus* o valor foi de 10,24 e para a *Bacillus pumilus* foi de 11,83, sendo estes os tratamentos onde houve maior crescimento microbiano.

Tabela 8 – Relação entre a tensão superficial inicial e final e entre a concentração de biomassa final e inicial para *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*.

Tratamentos	<i>Bacillus methylotrophicus</i>		<i>Bacillus pumilus</i>	
	RTS	RCB	RTS	RCB
T1	0,99±0,001	5,06±0,14	1,10±0,018	6,66±1,10
T2	1,24±0,009	7,57±0,61	1,02±0,004	9,35±0,21
T3	1,11±0,024	6,30±0,28	1,29±0,011	4,20±0,09
T4	1,03±0,006	10,24±0,03	1,58±0,012	11,83±0,12
T5	1,01±0,011	5,12±0,09	1,19±0,011	4,67±0,24
T6	1,16±0,011	4,13±0,16	1,15±0,003	2,26±0,06
T7	0,94±0,006	8,34±0,09	1,09±0,007	3,96±0,06
T8	0,91±0,005	3,26±0,15	1,03±0,001	2,46±0,20
T9	0,98±0,004	4,20±0,25	1,01±0,015	4,34±0,06
T10	0,97±0,005	5,43±0,13	1,01±0,003	2,95±0,19
T11	1,13±0,008	6,76±0,18	1,20±0,011	1,49±0,04
T12	1,13±0,018	3,01±0,22	1,14±0,043	1,86±0,01
T13	0,96±0,009	2,92±0,19	1,04±0,024	0,95±0,05
T14	0,93±0,008	4,01±0,09	1,00±0,007	2,04±0,01
T15	0,98±0,002	2,33±0,07	0,96±0,002	1,69±0,01
T16	0,94±0,008	5,99±0,07	0,94±0,011	2,30±0,05

* Resultados de média ± desvio padrão; RTS: Relação entre a tensão superficial inicial e final; RCB: Relação entre a biomassa final e inicial;

Levando em consideração a redução da tensão superficial nos 16 tratamentos pode-se observar que para *Bacillus methylotrophicus* o maior crescimento dos microrganismos não indicou maior redução da tensão superficial, pois o tratamento em que se obteve maior redução da tensão foi o T2. No entanto, para *Bacillus pumilus*, o tratamento em que se obteve maior redução da tensão superficial é o mesmo em que houve maior crescimento microbiano, podendo ambos estarem interligados.

Para melhor entendimento da influência das variáveis sobre a tensão superficial realizou-se análise de variância dos resultados através do módulo Experimental Design do Software Statistica 8.0, utilizando os valores referentes à relação da tensão superficial inicial e final. Para a concentração de biomassa não se realizou a análise de variância dos resultados por não ser esse o produto de interesse, mas sim a tensão superficial, sendo que este parâmetro foi analisado para verificar se haveria relação entre o crescimento microbiano e a redução da tensão superficial.

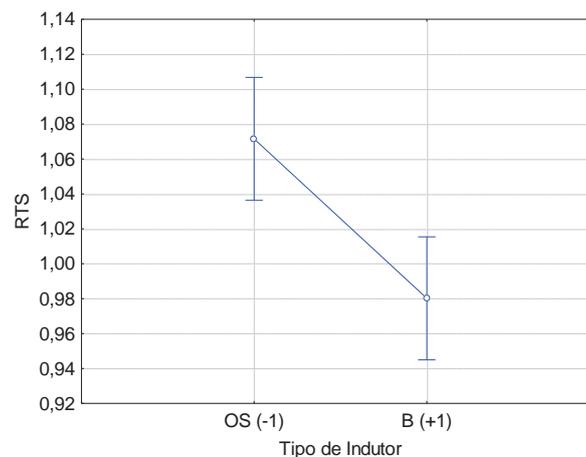
A Tabela 9 apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas, (fonte de nitrogênio, concentração da fonte de nitrogênio, adição da solução de micronutrientes, tipo de indutor e concentração de indutor), sobre a tensão superficial, para fermentação com *Bacillus methylotrophicus*. A única variável significativa para a redução da tensão superficial foi tipo

de indutor, sendo que a maior redução da tensão superficial ocorreu no nível -1, com efeito principal negativo, na presença de óleo de soja (Figura 16).

Tabela 9 – Efeitos estimados das variáveis para *Bacillus methylotrophicus*, para fermentação submersa com permeado da ultrafiltração de soro de leite.

Fonte de Variação	Efeitos Estimados	p (nível de significância)
Média	1,0258	0,0000
Blocos	-0,0467	0,0651
(1) Tipo da Fonte de Nitrogênio	-0,0039	0,8738
(2) Conc. da Fonte de Nitrogênio	0,0274	0,2723
(3) Adição Solução de Micronutrientes	-0,0095	0,7032
(4) Tipo de Indutor	-0,0913	0,0006
(5) Concentração de Indutor	-0,0081	0,7457

Figura 16 – Efeito do tipo de indutor na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*, a partir do permeado de ultrafiltração de soro de leite.



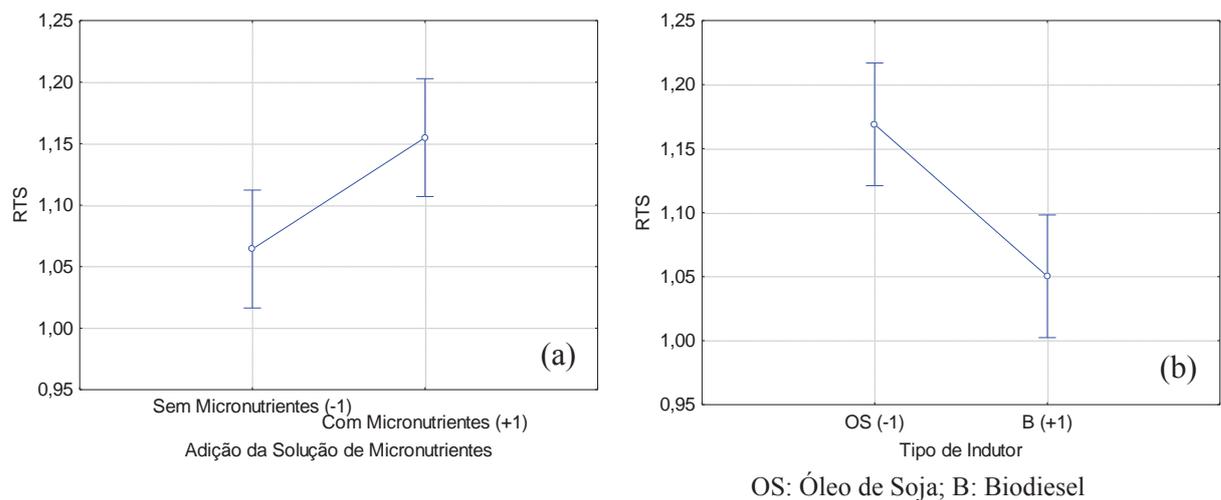
OS: Óleo de Soja; B: Biodiesel

A Tabela 10 apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas, (fonte de nitrogênio, concentração da fonte de nitrogênio, adição da solução de micronutrientes, tipo de indutor e concentração de indutor), sobre a tensão superficial, para fermentação com *Bacillus pumilus*. As variáveis significativas sobre a redução da tensão superficial foram adição da solução de micronutrientes e o tipo de indutor, sendo que a maior redução da tensão superficial ocorreu no nível +1, com efeito principal positivo, para a variável adição da solução de micronutrientes (Figura 17a), e no nível -1, com efeito principal negativo, para a variável tipo de indutor (Figura 17b), na presença de óleo de soja.

Tabela 10 – Efeitos estimados das variáveis para *Bacillus pumilus*, para fermentação com permeado da ultrafiltração de soro de leite.

Fonte de Variação	Efeitos Estimados p (nível de significância)	
Média	1,1096	0,0000
Blocos	-0,1455	0,0001
(1) Tipo da Fonte de Nitrogênio	0,0376	0,2689
(2) Conc. da Fonte de Nitrogênio	-0,0007	0,9838
(3) Adição Solução de Micronutrientes	0,0906	0,0100
(4) Tipo de Indutor	-0,1187	0,0010
(5) Concentração de Indutor	0,0652	0,0590

Figura 17 – Efeito da adição da solução de micronutrientes (a) e do tipo de indutor (b) na redução da tensão superficial para a produção de biossurfactantes com *Bacillus pumilus*, a partir do permeado de ultrafiltração de soro de leite.



4.3.3 Repetição dos experimentos nas condições de ensaio com melhores resultados de redução de tensão superficial

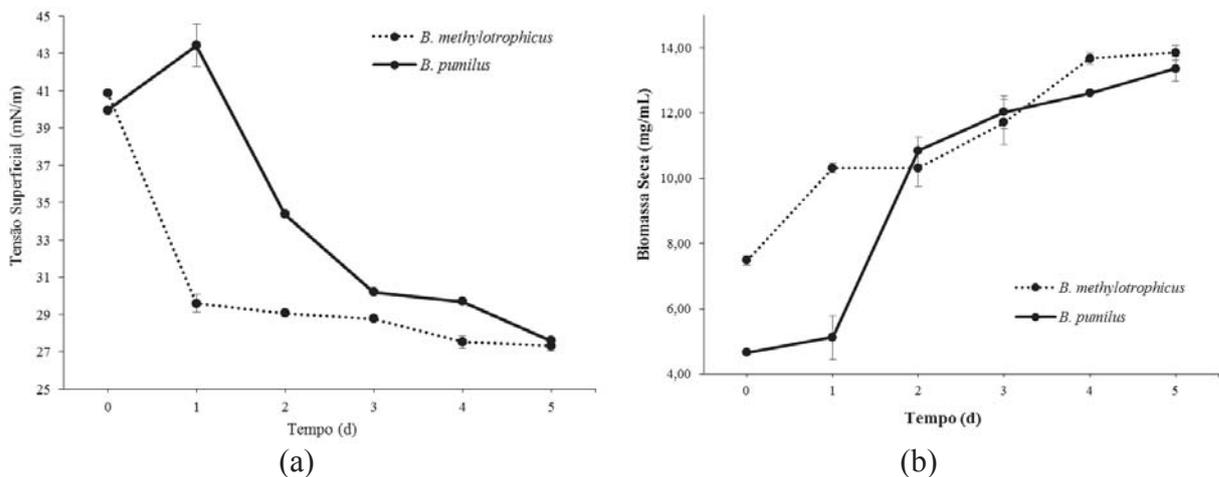
Além das variáveis significativas citadas anteriormente, para a fermentação submersa com soro de leite, independente do microrganismo utilizado, blocagem também apresentou influência significativa ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu na fermentação utilizando o permeado da ultrafiltração de soro de leite com *Bacillus pumilus*. No entanto, a blocagem foi necessária porque não havia como realizar todos os ensaios de uma única vez, o que pode ter dificultado a avaliação dos efeitos das variáveis sobre a tensão superficial.

Em função disso, os experimentos com maior redução da tensão superficial foram replicados, a fim de confirmar os resultados obtidos durante a execução do planejamento. Sendo que para ambos os resíduos, soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite,

o tratamento que teve destaque com relação à redução da tensão superficial do meio, foi o tratamento 4 (T4), o qual foi realizado com adição de sulfato de amônio, na concentração de 1,0%, com micronutrientes e como indutor óleo de soja, na concentração de 2,0%, sendo que para soro de leite realizou-se a fermentação submersa com *Bacillus methylotrophicus* e para o permeado da ultrafiltração de soro de leite com *Bacillus pumilus*. Os experimentos foram realizados por 5 dias em duplicata.

A Figura 18 apresenta a redução da tensão superficial (a) e a concentração de biomassa (b) ao longo da fermentação para os experimentos replicados que apresentaram os melhores resultados do planejamento.

Figura 18 – Variação da tensão superficial (a) e da concentração de biomassa (b) no decorrer dos 5 d de fermentação, para o tratamento 4 (T4)*.



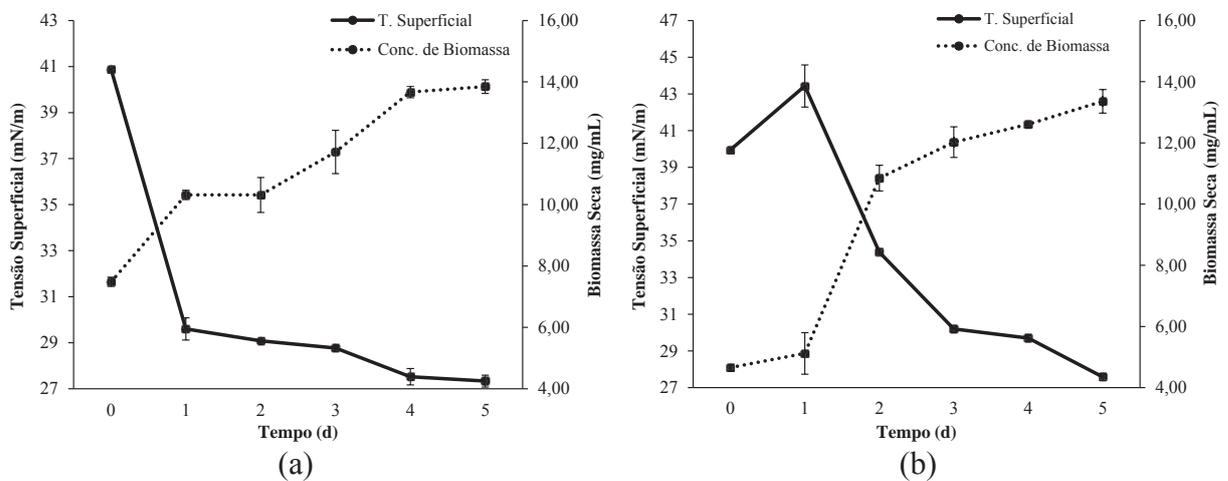
Condições de ensaio: *adição de sulfato de amônio, concentração de 1,0%, com micronutrientes e óleo de soja na concentração de 2,0%, com soro de leite para *Bacillus methylotrophicus* e permeado da ultrafiltração de soro de leite para Bactéria B.

Para *Bacillus methylotrophicus* pode-se observar que após 1 d de fermentação a tensão superficial tem uma queda acentuada, diminuindo aos poucos no decorrer dos demais dias de fermentação. Já para *Bacillus pumilus*, no início ocorre um pequeno aumento da tensão superficial, o que pode ser devido à utilização dos componentes do meio por parte dos microrganismos, após isso, ocorre o início da redução da tensão superficial (Figura 18a). Para ambos os microrganismos a tensão mínima obtida foi de em torno de 27 mN/m, muito próxima da obtida no primeiro planejamento e que foi de 27,51 mN/m para *Bacillus methylotrophicus* e 26,02 mN/m para *Bacillus pumilus*. Isto demonstra a estabilidade do microrganismo, o que é um dos requerimentos desejáveis para microrganismos de uso industrial (SCHMIDELL et al., 2001).

Os microrganismos apresentaram comportamentos diferenciados também em relação ao crescimento (Figura 18b), no entanto ao final dos 5 d de fermentação, as concentrações de biomassa atingidas foram semelhantes (13,85 mg/mL e 13,36 mg/mL, respectivamente, para *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*).

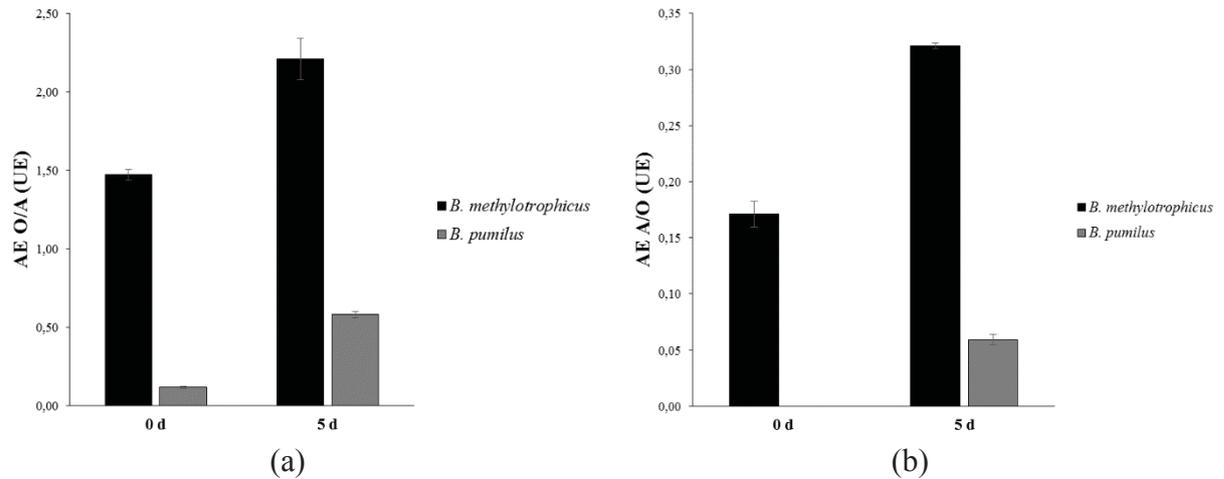
Para verificação da relação entre a redução da tensão superficial com o crescimento microbiano plotou-se as duas variáveis no mesmo gráfico, como pode ser observado na Figura 19 para as bactérias *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*.

Figura 19 – Relação entre a tensão superficial e a concentração de biomassa para *Bacillus methylotrophicus* (a) e *Bacillus pumilus* (b).



Através da Figura 19 pode-se observar que a maior redução da tensão superficial ocorreu com o maior crescimento microbiano, isso está de acordo com o afirmado por Pinto et al., (2009) que afirma que a maioria dos biossurfactantes são liberados no meio de cultura na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento. Além das análises diárias de tensão superficial e concentração de biomassa realizaram-se no tempo 0 d e 5 d as análises de atividade emulsificante O/A e A/O, sendo que os resultados podem ser observados nas Figuras 20, respectivamente.

Figura 20 – Atividades emulsificantes O/A (a) e A/O (b) para ambos os microrganismos.



Através da Figura 20 pode-se observar que para ambos os microrganismos houve aumento da AE O/A e A/O após 5 d de fermentação. O aumento da atividade emulsificante se deve a presença de biossurfactantes no meio fermentado (DUBEY et al, 2012).

Com relação à AE O/A, para *Bacillus methylotrophicus* houve um aumento de 0,74 UE e para *Bacillus pumilus*, 0,46 UE, ao longo dos 5 d de fermentação. Para a AE A/O verifica-se que houve maior atividade quando foi realizada a fermentação com *Bacillus methylotrophicus*, aumento de 0,15 UE.

Para a fermentação com *Bacillus methylotrophicus* no qual o resíduo da fermentação foi soro de leite, pode-se verificar alta atividade emulsificante no tempo inicial, isso se deve aos componentes emulsificantes presentes naturalmente no soro de leite. Segundo Borges (2000) e Antunes (2003), as proteínas do soro são conhecidas por suas características funcionais, principalmente pelas propriedades emulsificantes.

As bactérias mais estudadas para a produção de biossurfactantes em fermentação submersa são *Pseudomonas* e *Bacillus* (MULLIGAN, 2009), sendo que a seguir seguem alguns estudos referentes a produção deste biocomposto com resíduos semelhantes aos utilizados neste estudo.

Dubey e Juwarkar (2001) realizaram o cultivo da estirpe *Pseudomonas aeruginosa* BS2, com soro de leite objetivando a produção de biossurfactantes. Em 48 h de incubação, o rendimento de biotensoativo obtido foi de 0,92 g/L, sendo que a produção máxima ocorreu após a ocorrência de condições de limitação de nitrogênio. O biossurfactante produzido possuía as propriedades tensoativas fortes, uma vez que reduziu eficazmente a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m. Em nosso trabalho o valor mínimo de tensão superficial obtido foi muito próximo ao do trabalho citado (27,51 mN/m), o que pode ser

devido ao detrimento de nitrogênio ao final do processo fermentativo longo (5 dias). Verificou-se ainda que o soro de leite foi um dos melhores substratos para a produção de biotensioativo porque não foi necessária nenhuma suplementação adicional de qualquer tipo de nutriente nestes resíduos, devido ao soro de leite é uma fonte rica de minerais como o cálcio, fósforo, potássio, sódio, cobre e ferro. E também uma boa fonte de vitaminas do complexo B, riboflavina e ácido pantotênico (NICKERSON, 1974). Resultados semelhantes foram obtidos em meio sintético de glicose o que indicou que com a utilização do resíduo não houve atraso no início da produção de biossurfactante, e os componentes nutricionais foram utilizados de forma eficiente para o crescimento da biomassa e a produção de biossurfactante.

Com relação ao consumo de nitrogênio, houve maior consumo no soro de leite, devido a presença de proteínas e aminoácidos facilmente utilizáveis pela *Pseudomonas*, o que resultou em maior crescimento microbiano e maior redução da tensão superficial (DUBEY; JUWAKAR, 2011). Os principais ácidos presentes no soro de leite, ácido acético e ácido láctico, foram consumidos, deixando a sacarose e lactose sem serem utilizadas. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* utiliza diferentes tipos de ácidos tais como acetato, propionato, butirato e lactato e não fermenta açúcares tais como lactose e sacarose (Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, 1984). Por isso, os estudos mostraram que a multiplicação de células e produção do biossurfactante foi apenas à custa dos ácidos totais, e fosfato e nitrogênio, compostos que estavam presentes em abundância no soro de leite.

Dubey et al. (2012) avaliaram o potencial de biossurfactantes produzidos a partir de soro de leite por *Pseudomonas aeruginosa* e *Kocuria turfanensis*, através das análises de tensão superficial, concentração micelar crítica e índice de emulsificação, em condições ambientais extremas, pH variando de 2 a 11, salinidade de 5% a 20% e temperatura de 30°C a 121 °C. Os resultados demonstraram que houve uma quantidade significativa de produção de biotensioativo pela bactéria *P. aeruginosa*, sendo que isto ficou evidente, pois houve a redução da tensão superficial do soro de leite fermentado da gama de 56 mN/m para 27 mN/m, indicando a produção de biotensioativo eficaz. A tensão superficial obtida em nosso estudo (27,51 mN/m) foi muito próxima a relatada na bibliografia, o que é um indicativo da produção de biossurfactantes.

De acordo com a literatura, a bactéria *P. aeruginosa* é o microrganismo mais amplamente estudado para a produção de biossurfactantes, sendo que a maioria dos biossurfactantes produzidos por este microrganismo têm demonstrado a capacidade de redução de tensão superficial para cerca de 28 mN/m - 27 mN/m (GAUTAM; TYAGI, 2006; BORDOLOI; KONWAR, 2007; SILVA et al., 2010; SHAVANDI et al., 2011.).

Silva et al. (2014) realizaram um estudo com quatro espécies de *Pseudomonas* (*P.cepacia*, *P.acidovorans*, *P.picketti* e *P. fluorescens*), as quais foram cultivadas em diferentes substratos de baixos custo e comparados em relação à produção de biossurfactante. A tensão superficial foi usada como padrão preliminar para avaliar o potencial de as bactérias produzirem biossurfactantes. A fermentação foi realizada em meio mineral suplementado com 2,0% de substrato de baixo custo (resíduos de fritura de óleo de canola, resíduos de soro de leite, resíduos de fritura de óleo de soja, água de maceração de milho). A fermentação com soro de leite como substrato não obteve redução eficaz da tensão superficial, sendo que a menor tensão obtida foi de 45,59 mN/m para a bactéria *P. fluorescens*. Nosso estudo obteve maior redução da tensão superficial ao obtido na referida pesquisa, a diferença do resultado pode ser devido ao microrganismo não ser o mesmo e o meio não estar suplementado.

Devido a *Pseudomonas aeruginosa* ter dificuldade na assimilação da lactose, Koch e colaboradores (1988), desenvolveram uma estirpe de *P. aeruginosa* para utilizar soro de leite para a produção de ramnolipídios, com um gene da *Escherichia coli*. As bactérias cresceram bem em meio à base de lactose, embora com taxas iniciais reduzidas em comparação com o crescimento no meio à base de glicose. Os biossurfactantes foram produzidos durante a fase estacionária de crescimento em meio mínimo à base de soro de leite, demonstrando que os resíduos podem ser eficazmente utilizados para importantes processos biotecnológicos.

Joshi et al. (2008), estudaram a produção de biossurfactantes por *Bacillus licheniformis* K51, *Bacillus subtilis* 20B, *Bacillus subtilis* R1e estirpe de *Bacillus* HS3 usando melação ou soro de leite como uma única fonte de nutrição. Os isolados foram capazes de crescer e produzir biossurfactante sob agitação, bem como condições estáticas. Com soro de leite como substrato ocorreu a redução da tensão superficial para 34 mN/m - 37 mN/m, para os isolados K51, R1 e 20B. No entanto, o isolado HS3 não conseguiu reduzir a tensão superficial para este nível, quando cultivado em condições semelhantes. Os valores de tensão superficial obtidos na referida pesquisa foram superiores aos observados em nosso estudo na realização da fermentação submersa com soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite.

Como pode ser verificado, em nosso estudo, para o soro de leite o microrganismo que obteve maior redução da tensão superficial foi a bactéria *Bacillus methylotrophicus*, já para o permeado da ultrafiltração de soro de leite o microrganismo que se destacou foi a bactéria *Bacillus pumilus*, isso pode ser devido às diferenças metabólicas entre os microrganismos.

De acordo com Henckel (2012) a composição ideal dos resíduos/subprodutos para o crescimento e produção de biossurfactantes é dependente das diferentes exigências

metabólicas dos diferentes microrganismos. Para a produção máxima de biossurfactantes o meio para fermentação deve ter concentrações ótimas de carbono, nitrogênio, fósforo e ferro, e as relações C: N, C: P e C: Fe devem ser adequadas.

4.3.4 Produção de biossurfactantes para o ensaio de biorremediação e identificação do biossurfactante produzido

Para a execução do ensaio de biorremediação realizou-se a produção de biossurfactante com *Bacillus methylotrophicus* e com soro de leite como resíduo, nas condições onde houve a maior redução da tensão superficial (sulfato de amônio - 1,0%, com micronutrientes e óleo de soja - 2,0%). Para a obtenção da quantidade necessária de biossurfactantes (3,84 g) foi necessário realizar 3 bateladas de produção. Realizou-se ainda mais uma batelada de produção de biossurfactantes para encaminhar para a identificação.

Após cada batelada de produção, juntou-se o meio fermentado de todos os erlenmeyers e realizou-se a análise de tensão superficial (Tabela 11).

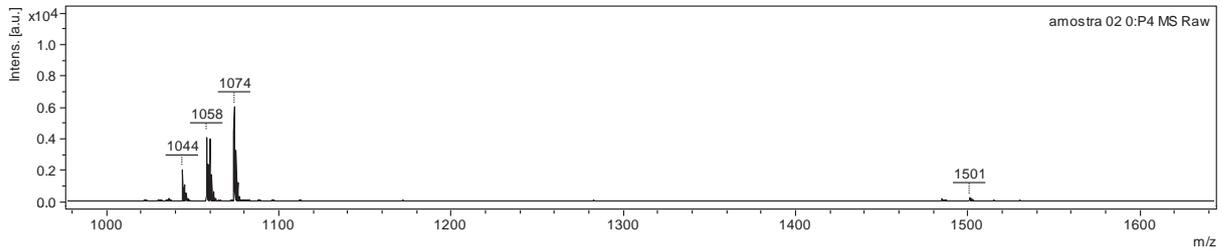
Tabela 11 – Análise da medida de tensão superficial das bateladas para o ensaio de biorremediação.

Batelada	Tensão Superficial (mN/m)
1 – Biorremediação	31,00±0,20
2 – Biorremediação	30,17±0,38
3 – Biorremediação	29,43±0,45
4 – Identificação	30,13±0,42

Pode se verificar que houve pouca variação da tensão superficial ao longo das diversas produções, variando de 31 mN/m a 29 mN/m, e um decréscimo de em torno de 13 mN/m ao longo dos 5 d de fermentação, já que a tensão superficial no tempo inicial, era de 43 mN/m.

Com relação à identificação dos biossurfactantes produzidos a massa molecular de lipopeptídios foi obtida utilizando MALDI-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry*). O perfil de lipopeptídios é caracterizado pelos íons com valores de m/z 1044, 1058 e 1074, que são identificados principalmente como moléculas de surfactinas e fengicinas protonadas e na forma de adutos de sódio e potássio (Figura 21), as quais representam as famílias de biossurfactante produzidas por *Bacillus* sp. (DOMINGOS et. al., 2015; KIM et. al., 2010).

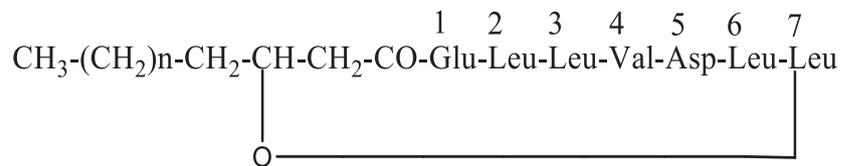
Figura 21 - Espectro de MALDI-MS de biossurfactantes produzidos por *Bacillus methylotrophicus* com a detecção dos íons que caracterização as isoformas de lipopeptídios.



Na Figura 21, têm-se os espectros de MALDI-MS com expansão na região de m/z 1000 a 1140, mostrando a caracterização da estrutura química do biossurfactante produzidos pela bactéria. Os íons de m/z 1044, 1058 e 1074 são íons de moléculas homologas do biossurfactante identificado como surfactina (TORRES *et. al.*, 2015).

Considerando a sequência típica de aminoácidos da estrutura da surfactina, têm-se Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu conectadas por ligações peptídicas entre a porção ácido carboxílico (-COOH) da Leu7 e a porção amino (-NH₂) da Glu1 (Pathak *et al.*, 2014) (Figura 22).

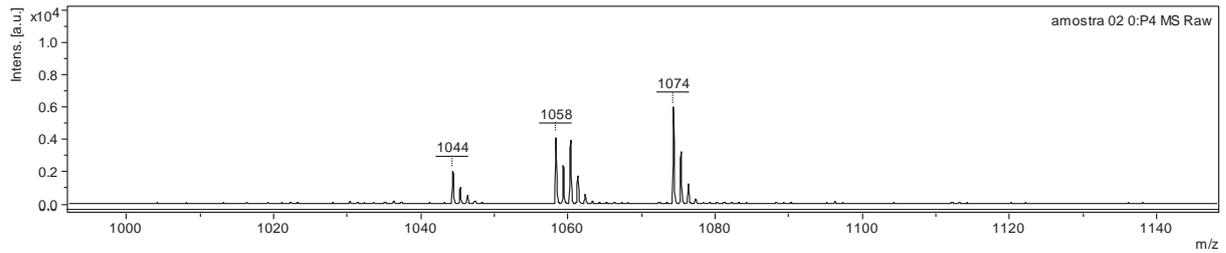
Figura 22 - Esquema da estrutura primaria de uma surfactina.



Adaptada de Pathak *et al.*, 2014.

Com base na sequência de aminoácidos da surfactina (Figura 22), voltando para os espectros de massas (Figura 23) onde se observam os íons de m/z 1044 e 1074, estes íons correspondem à série homologa de carbonos 14 e 16 e sequencia de aminoácidos [Val4 -Asp5 -Leu6 -Leu7 (OH)+H+Na]⁺.

Figura 23: Espectro de MALDI-MS com ampliação da região de m/z 1000 a 1140 caracterizando as isoformas da surfactina proveniente da bactéria *Bacillus methylotrophicus*.



Na Tabela 12, tem-se o resumo dos íons caracterizados para cada amostra analisada.

Tabela 12 – Resumo dos íons caracterizados.

Amostra	m/z	Biossurfactante	Referência
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1030	Surfactina (C13)	Pathak <i>et al.</i> , 2014
	1044	Surfactina (C14)	
	1058 e1074	Surfactina (C15)	

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus* (COSTA, 2005). O primeiro relato sobre a produção de surfactina ocorreu em 1968 (ARIMA et al., 1968), com a apresentação de um novo composto biologicamente ativo presente no meio de cultivo de *Bacillus*, o qual exibiu excelente atividade surfactante.

A estrutura química da surfactina foi posteriormente elucidada por Kakinuma et al. (1969), como sendo a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (LANG, 2002).

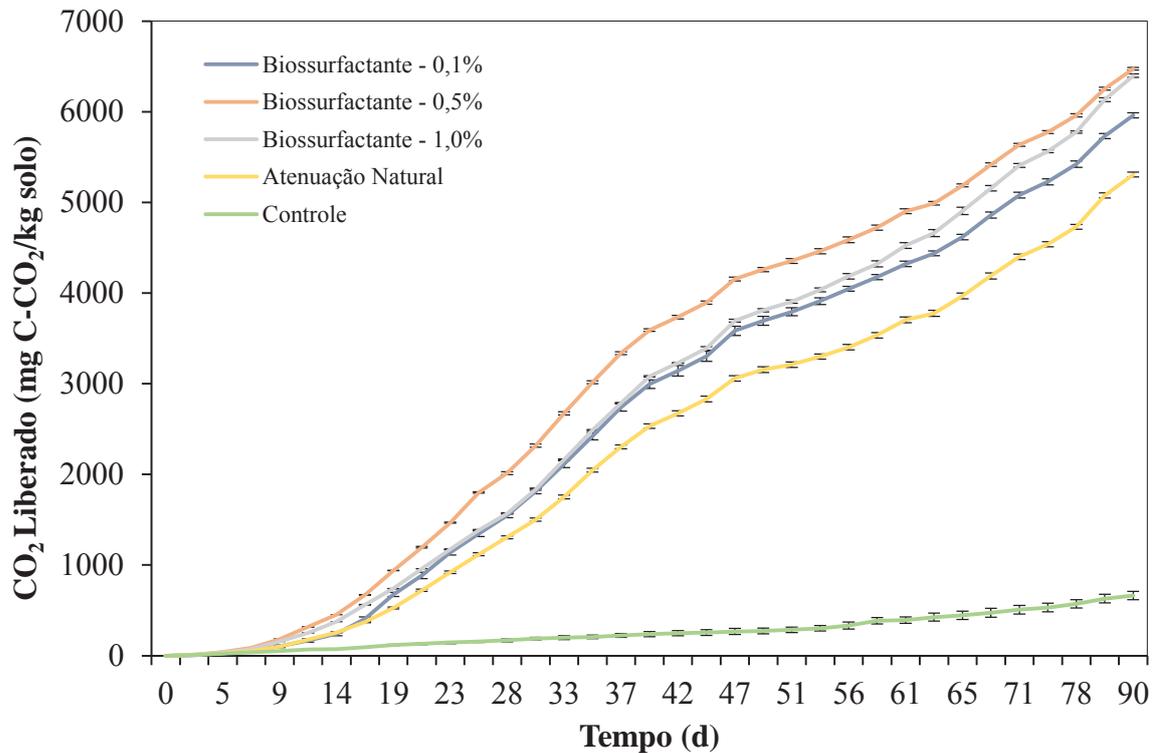
A surfactina é conhecida por ter excepcional atividade superficial, podendo reduzir a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m (LANG, 2002; WEI et al., 2002), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m (BARROS et al., 2007). Os valores relatados para a CMC da surfactina encontram-se em torno de 10 mg/L (DE OLIVEIRA et al., 2013), 12,4 mg/L (HUANG et al., 2015) e 20 mg/L (GUDIÑA et al., 2012; LIU et al. 2015). Além de propriedades surfactantes poderosas, a surfactina exibe uma excelente estabilidade em variações de pH, temperatura e força iônica e apresenta atividade hemolítica (DESAI; BANAT, 1997).

Quando é comparada a outros biossurfactantes e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA), possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta menores valores de concentração micelar crítica (CMC) (KIM et al., 1997).

4.4 Ensaio de biorremediação

A Figura 24 apresenta a liberação de CO₂ durante o tempo do ensaio de biorremediação.

Figura 24 – Liberação de CO₂ ao longo dos 90 dias de experimento.



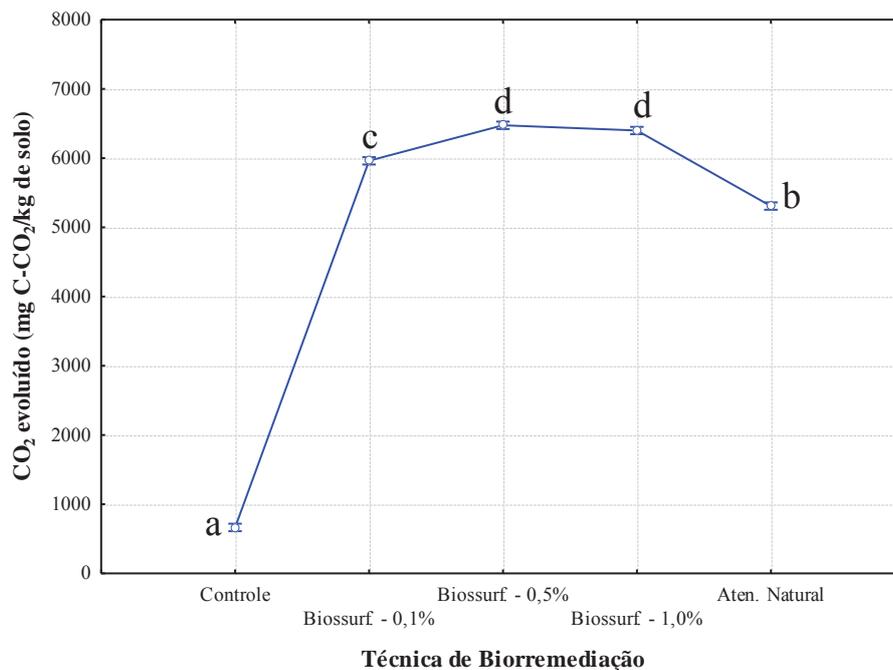
Através da Figura 24 pode-se observar que nos primeiros 12 dias de ensaio houve pouca atividade respiratória, isso se deve provavelmente a ocorrência de uma fase de adaptação dos microrganismos ao tipo e a concentração do contaminante. Posteriormente houve maior liberação de CO₂, indicando aumento da população microbiana, o que ocorreu devido a utilização das fontes de nutrientes presentes. Os maiores incrementos na liberação de CO₂ ocorreram durante os primeiros 47 dias de experimento.

Para melhor entendimento da influência da variável sobre a liberação de CO₂ realizou-se análise de variância dos resultados através do módulo ANOVA do Software Statistica 8.0, utilizando os valores referentes à liberação de CO₂ nos 90 d. A Tabela 13 apresenta a análise de variância dos dados de liberação de CO₂ nos 90 d de ensaio em função da variável, técnica de biorremediação.

Tabela 13 – Análise de variância dos dados de liberação de CO₂.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
Técnica de Biorremediação	47881330	4	11970332	13834,8	≤ 0,001
Erro	4326	5	865		

A Tabela 13 demonstrou que a variável técnica de biorremediação, teve efeito significativo sobre a liberação de CO₂ ($p < 0,05$). A Figura 25 apresenta a interação e comparação das médias da liberação de CO₂ em função da técnica de biorremediação, com as letras referentes ao teste de Tukey.

Figura 25 – Liberação de CO₂ total em função da técnica de biorremediação.

OBS: Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística ao nível de 95% de confiança.

Os tratamentos com a adição de biossurfactantes demonstraram um maior valor acumulado de C-CO₂ se comparado com os demais tratamentos, este efeito provavelmente se deve a ação dos biossurfactantes, os quais mesmo em baixas concentrações agiram como emulsificantes, deixando o contaminante mais disponível para os microrganismos, resultando em maior crescimento microbiano e acréscimo na liberação de CO₂.

A adição de biossurfactante na concentração de 0,5% obteve o valor acumulado de 6.474,41 mg C-CO₂/ kg de solo, sendo superior ao valor obtido com a concentração de 1,0% de biossurfactante (6.399,02 mg C-CO₂/ kg de solo), seguido do tratamento com a inserção de 0,1% (5.962,17 mg C-CO₂/ kg de solo). No entanto, através do teste de Tukey verificou-se que a adição de biossurfactante nas concentrações de 1,0% e 0,5% não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), diferindo das demais técnicas.

No tratamento com atenuação natural foi possível verificar que apenas a população microbiana foi capaz de se adaptar ao meio contaminado e apresentar taxas de respiração microbiana, sendo o valor acumulado de 5.307,63 mg C-CO₂/ kg de solo. Já o experimento controle caracterizou-se por ser o tratamento com menor liberação de CO₂ (664,51 mg C-CO₂/kg de solo), isso se deve a não se ter adicionado o contaminante e o biossurfactante, não havendo estímulo ao crescimento dos microrganismos presentes, sendo realizado com a intenção de verificar qual seria o CO₂ liberado no solo em condições normais. Houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os resultados de liberação de CO₂ para os tratamentos de atenuação natural, controle e adição de 0,1% de biossurfactante.

Decesaro (2013) realizou um estudo, no qual o objetivo foi avaliar a capacidade de biorremediação de solo contaminado com compostos oleosos, utilizando a técnica de bioestimulação. Neste estudo, o solo foi contaminado com 4% de óleo diesel ou biodiesel e bioestimulado com ficocianina, biomassa inativa da *S. platensis* ou com sulfato de amônio. O sulfato de amônio e a biomassa inativa foram utilizados na proporção de 1,5% em relação à massa de solo e a ficocianina na porcentagem de 0,5%. A porcentagem do sulfato de amônio a ser adicionada foi calculada através da relação C:N:P:K, a partir do C presente no contaminante, para se alcançar a relação ótima. A liberação de CO₂ nos ensaios contaminados com biodiesel e adicionados do bioestimulante sulfato de amônio, foi de 9.212,3 mg C-CO₂/kg solo, já nos ensaios contaminados com óleo diesel a liberação de CO₂ foi de 4.7333,0 mg C-CO₂/kg solo. Em nosso estudo os valores de CO₂ liberado para o contaminante biodiesel foram inferiores, no entanto com a adição das concentrações de biossurfactantes a relação ótima C:N:P:K não foi atendida, da mesma maneira acredita-se que o biocomposto agiu como biossurfactante.

De acordo com Burghoff (2012), os biossurfactantes aumentam as áreas da superfície dos compostos insolúveis que conduzem a um aumento da mobilidade e biodisponibilidade dos compostos, além disso, a interação com a superfície da célula aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos possam se associar mais facilmente com células microbianas, como consequência, melhoram a biodegradação e remoção dos

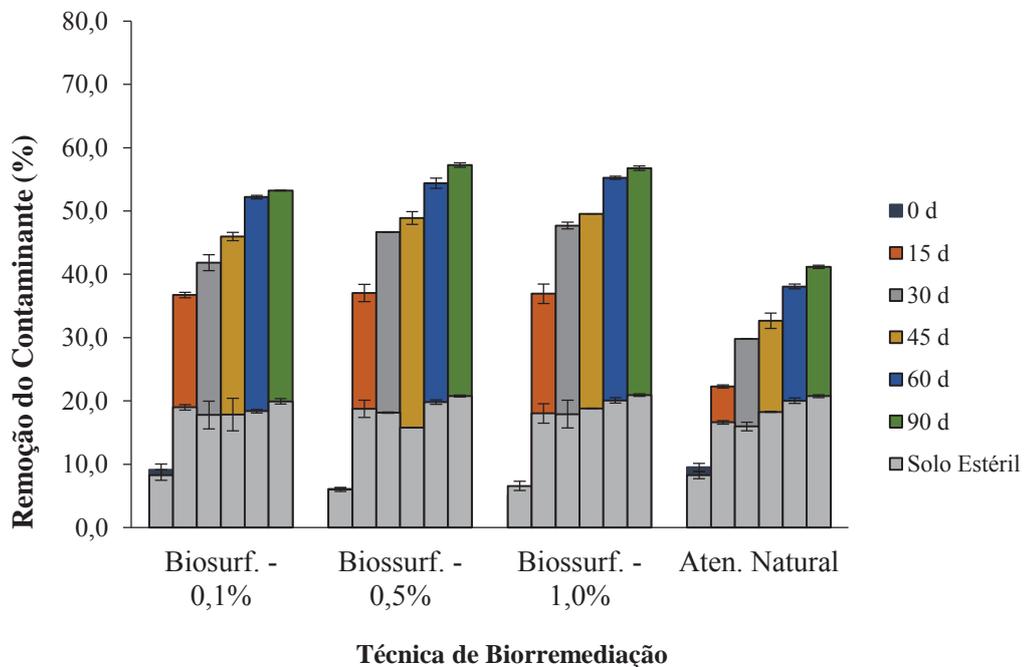
compostos oleosos (NIEVAS et al., 2008; HAZRA et al., 2012), presentes no solo contaminado.

A quantificação do CO₂ liberado é uma das formas de avaliar a atividade metabólica microbiana nos solos em condições aeróbicas. A técnica provê importante informação acerca da biodegradação de compostos orgânicos, pois é indicativa do grau de mineralização dos contaminantes presentes no substrato (HOREL; SCHIEWER, 2009), e, portanto, da completa degradação dos mesmos. No entanto, a quantidade de contaminante degradado pode ser subestimada, caso parte da matéria orgânica degradada seja utilizada na produção de biomassa, ou superestimada, se o CO₂ produzido provir da degradação de uma fonte de carbono disponível no solo que não o contaminante (HOREL; SCHIEWER, 2009). Então para fornecer maior acurácia aos dados, a biodegradação do biodiesel foi também avaliada através da análise de óleos e graxas – método 3050B, USEPA.

4.4.1 Remoção do contaminante

A Figura 26 apresenta o percentual de remoção do contaminante ao longo do tempo.

Figura 26 – Remoção do contaminante em 90 d de experimento.



Através da Figura 26 é possível observar que para os tratamentos com solo não estéril, as maiores taxas de remoção do contaminante ocorreram nos primeiros 30 dias de

experimento, e isso se deve a maior fase de crescimento dos microrganismos e como consequência maior remoção. Observa-se ainda que nos tratamentos com a inserção do biossurfactante ocorreu maior remoção do contaminante se comparados ao experimento com a atenuação natural.

Nos tratamentos com solo estéril, a remoção do contaminante pode ser devido à retenção na matriz do solo, pois não havia possibilidade de degradação microbiana. Nota-se que no tempo inicial, já se observam valores de em torno 10% de remoção. De acordo com Cecchin et al. (2016) o processo mais acelerado de sorção do contaminante no solo ocorre no período de 0 a 15 dias, reduzindo sua taxa no período final do experimento. Associa-se este resultado ao fato de que as interações mais rápidas entre a superfície mineral e o composto existente no meio se dão em reações de superfície. Os processos de sorção subsequentes acabam sendo associados à migração do contaminante para as saliências microscópicas existentes na partícula mineral, resultando em uma redução complementar do contaminante em um tempo posterior.

Segundo Weissenfels et al (1992), podem ser observados dois tipos de cinética de adsorção dos contaminantes orgânicos no solo. O processo inicial de sorção é classificado como rápido, ocorrendo nos primeiros dias de contato solo/contaminante, refletindo os efeitos de acelerada interação entre o composto hidrofóbico e as áreas externas e de fácil acesso das partículas orgânicas e minerais do solo. Após esta etapa, tem-se um processo dito “lento”, no qual ocorre a migração dos contaminantes orgânicos para áreas menos acessíveis na matriz do solo (áreas internas).

Desta maneira, conforme aumenta o tempo de contato solo/contaminante, gera um maior período para a migração destes compostos para áreas menos acessíveis do solo, sendo encerrado este processo até a saturação completa dos sítios ativos presentes nas partículas. Assim, tem-se que os compostos que migraram para tais compartimentos acabam tornando-se a fração não passível de degradação na contaminação de solos (REID et al, 2000). Devido a isso no tempo inicial do nosso experimento houve a retenção de 6,0% a 8,0% do contaminante, passando a aproximadamente 18% nos 15 d e aumentado de maneira lenta nos demais 75 d de experimento, atingindo o valor máximo de remoção de em torno de 20% em todos os experimentos em que o solo se encontrava estéril.

Para uma melhor interpretação dos resultados e interação da variáveis, realizou-se análise de variância dos resultados através do módulo ANOVA do Software Statistica 8.0, utilizando os valores referentes à remoção do contaminante nos 90 dias. A Tabela 14 apresenta a análise de variância dos dados de remoção do contaminante em função das

variáveis, técnica de biorremediação (adição de biossurfactante e atenuação natural) e solo (estéril e não estéril).

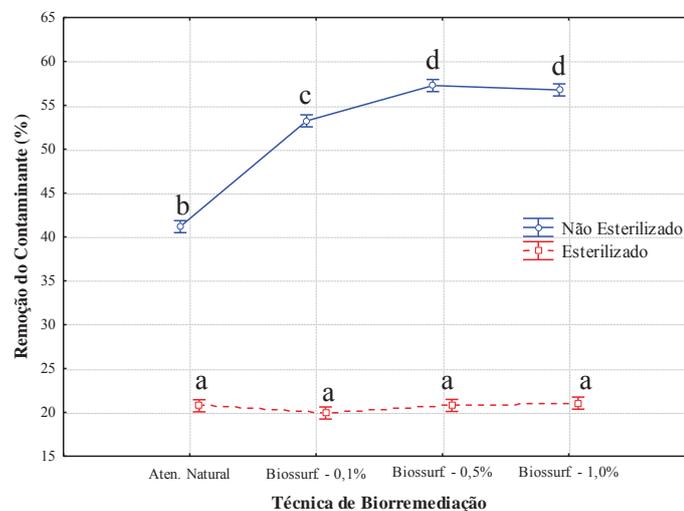
Tabela 14 – Análise de variância dos dados de remoção do contaminante em função das variáveis.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	P
Técnica de Biorremediação	170,88	3	56,96	318,6	$\leq 0,001$
Esterilização	3961,46	1	3961,46	22156,5	$\leq 0,001$
Técnica de Biorremediação X Esterilização	168,23	3	56,08	313,6	$\leq 0,001$
Erro	1,43	8	0,18		

Na Tabela 14 verifica-se que as variáveis, técnica de biorremediação e esterilização apresentaram valores de $p < 0,05$, logo estas demonstraram um efeito significativo sobre a remoção do contaminante.

A Figura 27 apresenta os efeitos gráficos da interação e comparação das médias da remoção do contaminante em função da técnica de biorremediação, com as letras referentes ao teste de Tukey.

Figura 27 – Remoção de biodiesel em solo esterilizado e não esterilizado.



OBS: Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística ao nível de 95% de confiança.

A remoção do contaminante para o tratamento com a adição de 0,5% de biossurfactante foi de 57,25%, não diferindo estatisticamente do valor de remoção do tratamento com 1,0% de biossurfactante (56,75%), diferenciado do tratamento com 0,1% de biossurfactante, com remoção de 53,23% e do tratamento com a técnica de atenuação natural, 41,17% de remoção.

Se compararmos os valores obtidos nos tratamentos com a adição de biossurfactante nas concentrações de 1,0% e 0,5%, com a técnica de atenuação natural nota-se que houve um acréscimo de 39% de remoção, isto demonstra que o biocomposto influenciou nas taxas de remoção do biodiesel, mesmo a concentração do biossurfactante estando abaixo da concentração para a relação ideal de C:N:P. De acordo com Cheng e Mulla (1999), a relação recomendada para biorremediação de solo é C:N:P de 100:10:1, desse modo acredita-se que o composto adicionado ao solo agiu como um biossurfactante.

Com relação aos tratamentos com o solo estéril, percebe-se que em todos os tratamentos a remoção do contaminante ficou em torno de 20%, não havendo diferença significativa, indicando que o percentual de biossurfactante não influenciou, na ausência dos microrganismos. Esse percentual de remoção ocorre devido à adesão do contaminante na matriz do solo, não sendo possível a remoção pelos métodos e solventes utilizados.

Caso o objetivo do estudo fosse a bioestimulação em condições nutricionais ótimas teríamos que adicionar o composto em concentrações mais elevadas, e isso poderia nos reportar ao problema demonstrado por Cecchin et al. (2016) onde ele verificou que a bioestimulação com adição de nutrientes, visando acelerar os processos de biodegradação de compostos orgânicos tóxicos acaba ocasionando menor interação entre o solo e o contaminante. Deste modo, quando utilizado a técnica de bioestimulação *in situ* com nitrogênio, fósforo e potássio, proporciona-se uma maior lixiviação do contaminante, a qual varia de acordo com a umidade do solo, ampliando a pluma de contaminação apresentando uma falsa impressão de redução do composto orgânico no solo, potencializando os efeitos nocivos da contaminação. Desse modo a inserção do biossurfactante deve ser estudada para aplicação *in situ*.

No presente estudo o biossurfactante no solo agiu de duas formas principais, aumentando a disponibilidade do contaminante para os microrganismos, e aumentando a hidrofobicidade da superfície, permitindo que o contaminante hidrofóbico se associasse mais facilmente com as células bacterianas, o que também foi verificado por Pacwa-Plociniczak et al. (2011), fazendo com que houvesse maior biorremediação do solo, pois segundo Harms e Bosma, (1997) a biodisponibilidade limitada dos compostos oleosos em um ambiente terrestre

devido à baixa solubilidade em água ou interações com a matriz do solo frequentemente geram uma inibição nas taxas de degradação dos contaminantes.

5 CONCLUSÕES

Após a execução do planejamento experimental com a realização da fermentação submersa com soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite para as bactérias *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus pumilus*, verificou-se que houve uma significativa redução da tensão superficial dos meios, indicando que ocorreu produção de biossurfactantes.

A maior redução da tensão superficial para fermentação com ambos os resíduos, soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite, foi com o tratamento suplementado com sulfato de amônio, na concentração de 1,0%, com micronutrientes e com óleo de soja como indutor, na concentração de 2,0% (T4), sendo que com soro de leite a fermentação submersa com *Bacillus methylotrophicus* obteve o valor de tensão superficial de 27,51 mN/m e o permeado da ultrafiltração de soro de leite com *Bacillus pumilus*, o valor obtido foi de 26,02 mN/m. Ambos os microrganismos apresentaram estabilidade de comportamento, pois na repetição do T4 obteve-se resultados muito próximos aos alcançados na execução do planejamento, confirmando a redução da tensão superficial.

Para a biorremediação utilizou-se o biossurfactante, produzido pela bactéria *Bacillus methylotrophicus*, caracterizado como surfactina, o qual foi eficiente e apresentou potencial de uso em processos de biorremediação de solos contaminados, pois elevou em torno 40% a remoção de biodiesel, sendo que 20% deste valor consiste em adsorção do contaminante ao solo, sem influência da presença ou não de biossurfactantes nos processos físico-químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, p. 305-325, 2008.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Amostras de Solo – Preparação para Ensaio de Compactação e Ensaio de Caracterização**. NBR 6457. Rio de Janeiro, 1986.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico - Procedimento**. NBR 14.283. Rio de Janeiro, 1999.
- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143-151, 2008.
- ACORSSINI, F. R. **Isolamento de levedura de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biosurfactantes em fontes alternativas de carbono**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2010.
- AIRES, A. G. **O soro de leite como suplemento proteico para atletas**. 2010. Monografia, Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- AL-AWADHI, N. M.; WILLIAMSON, K. J.; ISOK, J. D. Remediation of Kuwait's soil contaminated soils in hydrocarbon. **Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater**, 1992.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; JUNIOR RODRIGUES, P. H.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, mai/jun, 2014.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 137 p., 2003.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis** 18 ed. Washington: AOAC, 2005.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed., Arlington: AOAC International, 1995.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.
- ARROZ, S. D., SPIES, R. B., WOLFE, D. A. E., WRIGHT, B. A. Deliberações do derramamento de óleo simpósio Exxon Valdez. **Fisheries Society American**, Bethesda, Maryland, EUA, 1996.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production,

applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARROS, F. F. C. **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* em manipuladora**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

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

BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Biosurfactant and its catalytic activity in increasing crude oil mobility. **In: National Symposium and Indo-US Seminar on Catalysis**, Indian Institute of Petroleum, Deharadun, India, 2007.

BORGES, P. F. Z.; SGARBIERI, V. C.; DIAS, N. F. G. P.; JACOBUCCI, H. B.; PACHECO, M. T. B.; BALDINI, V. L. S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 411, p. 1-8, 2001.

BORGES, P. Z. **Avaliação nutricional de concentrados proteicos obtidos de leite bovino**. 2000. Dissertação (Mestre), Universidade Estadual de Campinas, 2000.

BRAILE, P. M. R.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais**. São Paulo: CETESB, 1979. p.139-154.

BRASIL. Lei 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2016.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Effluent generation by the dairy industry: preventive attitudes and opportunities. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 4, p. 487-497, 2007.

BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **Journal of Biotechnology**, v. 161, p. 126-137, 2012.

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

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J. A.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 441-448, 2008.

CECCHIN, I.; REGINATTO, C.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M.; REDDY, K. R. Influence of Physicochemical Factors on Biodiesel Retention in Clayey Residual Soil. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 4, p. 1-8, 2016.

CHA, M.; LEE, N.; KIM, M.; LEE, S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2192-2199, 2008.

- CHAGAS, E. M. B.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Avaliação preliminar da cinética de adsorção das proteínas do soro de queijo de coalho na resina de troca iônica Streamlinedeae. **In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005.
- CHAPRÃO, M. J. **Aplicação de Biossurfactantes na Remediação de Areia Contaminada com Hidrocarbonetos**. 2015. Dissertação (Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais), Universidade Católica de Pernambuco, 2015.
- CHEN, H. L.; JUANG, R. S. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 39-46, 2008.
- CHENG, H. H.; MULLA, D. J. The soil environment. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.1-13, 1999.
- CHHATRE, S.; PUROHIT, H.; SHANKER, R.; KHANNA, P. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 187-194, 1996.
- CHIRWA, E. N.; WANG, Y. T. Simultaneous Cr (VI) reduction and phenol degradation in anaerobic consortium of bacteria. **Water Res**, v. 34, n. 8, p. 2376–2384, 2000.
- COHN, F. Untersuchungen uber Bakterien. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, v. 1, p. 127-244, 1872.
- CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico Petrobrás**, v. 41, p. 133-138, 1998.
- COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.
- DE OLIVEIRA, D.W.F.; FRANÇA, I.W.L.; FÉLIX, A.K.N.; MARTINS, J.J.L.; GIROA, M.E.A.; MELO, V.M.M., 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.
- DECESARO, A. **Bioestimulação de solo contaminado por compostos oleosos com biomassa microalgal inativa**. 2013. 61 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.
- DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.
- DELLAGNEZZE, B. M.; SOUSA, G. V.; MARTINS, L. L.; DOMINGOS, D. F.; LIMACHE, E. E. G.; VASCONCELLOS, S. P.; CRUZ, G. F.; OLIVEIRA, V. M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum Reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, p. 191-200, 2014.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and management**, v. 50, p. 14-34, 2009.

- 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.
- DIMITROV, K.; GANCEL, F.; MONTASTRUC, L.; NIKOV, I. Liquid membrane extraction of bio-active amphiphilic substances: recovery of surfactin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 248-253, 2008.
- DOMINGOS, D. F.; DE FARIA, A. F.; GALAVERNA, R. S.; EBERLIN, M. N.; GREENFIELD, P.; ZUCCHI, T. D.; MELO, S. I.; TRAN-DINH, N.; MIDGLEY, D.; DE OLIVEIRA, V. M. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 3155-3167, 2015.
- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A., 1999. **Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo**. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3671/1/CNQA-C15-30%5B2%5D.PDF>>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHARAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 368–374, 2012.
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A., Distillery and curd wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 61-69, 2001.
- ESG - Environment Science Group, Savitok Point Hydrocarbon Bioremediation of the Former Tank Farm Pad QA/QC Report. **Technical report**. Kingston, Canadá, 2001.
- FERELLA, F.; MAZZIOTTI, G.; DE MICHELIS, I.; STANISCI, V.; VEGLIO, F. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 36–42, 2010.
- FONTES, E. A. F.; ALVES, Y. P. C.; FONTES, P. R.; MINIM, V. P. R. Bebida eletrolítica a base de permeado da ultrafiltração de leite: avaliação física, química e microbiológica durante o armazenamento. **Ciência Rural**, v.45, n. 2, p. 342-348, 2015.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactante from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.
- FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4156-4163, 2009.
- GARGHOURI, B.; KARRAY, F.; MHIRI, N.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. **Journal of Hazardous Materials**. v. 189: p. 427–434, 2011.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p. 155–166, 2006.
- GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Revista Brasil Alimentos**, n.10, p.43-46, 2001.
- 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. 1-7, 2015.

- HARMS, H.; BOSNA, T. N. P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 97 – 105, 1997.
- HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Biosurfactant-Assisted bioaugmentation in bioremediation. In: **Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment**. Eds.: SATYANARAYANA, T.; JOHRI B.N.; PRAKASH, A. Springer, New York, p. 631-664, 2012.
- HENCKEL, M.; MULLER, M. M.; KUGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; BONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207–1219, 2012.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J., SYLDATK, C. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**. v. 47, n. 8, 1207-19, 2012.
- HOREL, A.; SCHIEWER, S. Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. **Cold Regions Science and Technology**, v. 58, p. 113–119, 2009.
- HSUEH, Y. H.; SOMERS, E. B.; LERECLUS, D.; GHELARDI, E.; WONG, A. C. L. Biosurfactant production and surface translocation are regulated by PlcR in *Bacillus cereus* ATCC 14579 under low-nutrient conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7225-7231, 2007.
- HUANG, D.; ZHOU, H.; LIN, L. Biodiesel: An alternative to conventional fuel. **Energy Procedia**, v. 16, p. 1874–1885, 2012.
- HUANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LU, L. The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 381-389, 2015.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 195-199, 2008.
- KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total 153 structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 963-976, 1969.
- KANISSERY, R. G.; SIMS, G. K. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. **Applied and Environmental Soil Science**. v. 11: p 10-20, 2011.
- KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.
- KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, CHI, Y.-T. Production of biosurfactant lipopeptidios Iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.
- KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 187-201, 2002.
- KOCH, A. K.; REISER, J.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production, **Biotechnology**, v. 6, p. 1335-1339, 1988.
- KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 11, p. 1731-1737, 1992.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILIP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary butyl ether extraction. **Journal of Microbiology Methods**, v. 46, p. 149-156, 2001.
- LANG, S. Biological Amphiphiles: Microbial Surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 12-30, 2002.
- LAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2327-2339, 2013.
- LI, N. N.; FANE, A. G.; WINSTON HO, W. S.; MATSUURA, T. **Advance membrane Technology and Application**, John Wiley & Sons, 2008.
- LI, P. J.; SUN, T. H.; STAGNITTI, F.; ZHANG, C. G.; ZHANG, H. R.; XIONG, X. Z. ALLINSON, G.; MA, X. J.; ALLINSON, M. Field-scale bioremediation of soil contaminated with crude oil. **Environmental Engineering Science**, v. 19, n. 5, p. 277-289, 2002.
- LIMA, C. J. B. **Produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. 2007, 190 f. Tese (Doutor em Engenharia Química), Universidade Federal de Goiânia, Uberlândia, 2007.
- LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, p. 1020-1031, 2011.
- LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, 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.
- LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A. R.; ADELZADEH, M. R.; NOGHABI, K. A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 183-193, 2009.
- LUCENA, S. L.; SANTANA, C. C. Separation of bovine serum albumin and cytochrome C using gas-liquid interface adsorption. **Hungarian Journal of Industry and Chemistry**, v. 28, p. 81-84, 2000.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, R. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.-S.; SENTHILKUMAR, M.; LEE, K. C.; SUNDARAM, S. *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov., plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. **International Journal and Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2451-2457, 2010

- MAGALHÃES, K.T. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v.126, p.249-253, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610014196>>. Acesso em: 30 jan. 2016. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.012.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) Instrução normativa SDA nº 68 de 12/12/2006. Anexo métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 12 dez 2006.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1597-1605, 2012.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; BERTOLI, T. E.; COSTA, J. A., Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61c, p. 721-726, 2006.
- MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. 98 f. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- MCCARTHY, K.; WALKER, L.; VIGOREN, L.; BARTEL, J., Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an Arctic site. **Cold Regions Science and Technology**, v. 40, p. 31–39. 2004.
- MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BUCKER, F.; PERALBA, M. C. R.; FRAZZON, A. N. G.; OSTI, J. F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 356-363, 2014.
- MHATRE, B. A.; KUNDE, R. Biodegradation of diesel using microbes from a clam (*Meretrixmeretrix*) shell. **Indian Journal Geo-Marine Science**, v. 43, p. 877-881, 2014.
- MILLER, H. Bioestimulation as a form of bioremediation of soil pollutants. **Basic Biotechnology Journal**. v. 6: p. 7-12, 2010.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. 3^a Ed. 1, Heidelberg: Springer, 2006.
- MOHAN, V.S.; SHAILAJA, S.; KRISHNA, M.R.; REDDY, K.B.; SARMA, P.N. Bio slurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 644-652, 2006.
- MOLDES, A. B.; PARADELO, R.; RUBINOS, D.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J. M.; BARRAL, M. T. *Ex situ* treatment of hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants from *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9443-9447, 2011.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 372-378, 2009.

- MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008.
- MYERS, D. **Surfactant science and technology**, 3 ed. Wiley-Interscience, New York, 2006.
- NETO, P. F. da S.; SANTOS, R.; RIZZO, A. Estudo da aplicação de material estruturante na biorremediação de solos contaminados por petróleo em biorreator. **Comunicação Técnica - XIII Jornada de Iniciação Científica do CETEM**, 13-14 de julho de 2005, Rio de Janeiro, RJ.
- NGUYEN, T. T.; YOUSSEF, N. H.; MCINERNEY, M. J.; SABATINI, D. A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, v. 42, p. 1735-1743, 2008.
- NICKERSON, T. K. In **Fundamentals of Dairy Chemistry**, 2nd ed, eds. Webb, B.H., Johnson, A.M. & Alford, J.A. p. 273. Westport, Connecticut: A VI, 1974.
- NIEVAS, M. L.; COMMENDATORE, M. G.; ESTEVAS, J. L.; BUCALÁ, V. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 96-104, 2008.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 517-519, 1995.
- ORTEGA-CALVO, J. J.; TEJEDA-AGREDANO, M. C.; JIMENEZ-SANCHEZ, C.; CONGIU, E.; SUNGTHONG, R.; NIQUI-ARROYO, J. L.; CANTOS, M.; Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 733-745, 2013.
- PACWA-PLOCINICZAK, M., PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 633-654, 2011.
- PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E.V. Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 231-239, 2009.
- PANSIRIPAT, S.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; RUJIRAVANIT, R.; KITIYANAN, B.; SOMBOONTHANATE, P.; CHAVADEJ, S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 185-191, 2010.
- PARRA, J. L.; GUINEA, J.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADO, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, p. 874-879, 2006.
- PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADO, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, p. 874-879, 2006.
- PASSMAN, F.; DOBRANIC, J. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: **IASH 2005 9th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels**, p.18-22, 2005.
- PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1997.

- PATHAK, K.; KEHARIA, H. Identification of surfactins and iturins by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. **Biotechnology**, v. 4, p. 283-295, 2014.
- PESTA, G.; MEYER-PITTROFF, R.; RUSS, W.; Utilization of whey. In: OREOPOULOU, V.; RUSS, W., editors. **Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry**. Springer, 2007.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biosurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108. 2009.
- PRAVEESH, B. V.; SONIYAMBY, A. R.; MARIAPPAN, C.; KAVITHAKUMARI, P.; PALANISWAMY, M.; LALITHA, S. Biosurfactant Production by *Pseudomonas* Sp from Soil Using Whey as Carbon Source. **New York Science Journal**, n. 4, v. 4, p. 99-103, 2011.
- PRIETTO, P. D.; REGINATTO, C.; KORF, E. P.; THOMÉ, A.; CONSOLI, N. C. Comportamento hidráulico e reativo de uma mistura solo-cimento para barreiras de fundo em aterros de resíduos sólidos, in: **Congresso Brasileiro de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica**, 15 ed., ABMS, Gramado, RS, Brasil. "CD-ROM", 2010.
- RABUS, R.; HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 170, p. 377-384, 1998.
- RAMIREZ, E. M.; CAMACHO, J. V.; RODRIGO, M. A. R.; CAÑIZARES, P. C. Feasibility of electrokinetic oxygen supply for soil bioremediation Purposes. **Chemosphere**, v. 117, p. 382-387, 2014.
- RAZA, Z. A.; KHALID, Z. M.; BANAT, I. M, Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 44, p. 1367-1373, 2009.
- REGINATTO, C. **Bioventilação em um solo argiloso contaminado com mistura de diesel e biodiesel**. Passo Fundo: UPF, 2012. Dissertação de Mestrado em Engenharia, área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.
- REID, B. J.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments-a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental Pollution**. v. 108, p. 103-112. 2000.
- REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L. H.; HIRT, R., KÄPPELI, O.; FIECHTER, A., Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 985-989, 1986.
- RISER-ROBERTS, E. Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. **CRC Press LLC**, Boca Raton, FL, 1998.
- RODRIGUES L. R.; J. A. TEIXEIRA. Biosurfactants production from cheese whey," in Advances in Cheese Whey Utilization, CERDÁN, M. E.; GONZÁLEZ-SISO, M.; BECERRA, M. Eds., p. 81-104, **Transworld Research Network**, 2008.
- RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low cost fermentative médium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

- SANTOS, C. F. C. **Produção, purificação e caracterização de biosurfactante produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis***. 2001. 214 f. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- SARACHAT, T.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 324-330, 2010.
- SARIN, S.; SARIN, C. Production, isolation and application biosurfactant/bioemulsifier by oil contaminated soil isolated *Enterobacter cloacae* LK5. **Naresuan University Journal**, v. 16, p. 113-125, 2008.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 187 – 195, 2005.
- SARON, M. L. G. **Aproveitamento do permeado de soro de leite bovino através da transformação da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de cultura de bactérias probióticas**. 2003. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 436-458, 2010.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography**, v. 693, p. 7-13, 1995.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Coordenadores. **Biociencia Industrial**. São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda., V. 2, p. 560
- SCHÜLLER, A. **Produção de biodiesel e controle de qualidade por cromatografia**. Disponível em: <[http://www.perkinelmer.com.br/home/seminarios/biodiesel%20_%20p of.% schuller.pdf](http://www.perkinelmer.com.br/home/seminarios/biodiesel%20_%20p%20of%20schuller.pdf)>. Acesso em: out. 2014.
- SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.
- SHAFEEQ, M.; KOKUB, D.; KHALID, Z. M.; KHAN, A. M.; MALIK, K. A. Degradation of different hydrocarbons and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 505-510, 1989.
- 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, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A., SARUBBO, R. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 132–139, 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, 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* UCP 0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p.174–183, 2010.

SIM, L.; WARD, O. P.; LI, Z. Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 232-238, 1997.

SISO, G. M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, p. 3705-3723, 2010.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R. M. Biosurfactants: a General Overview. **Springer-Verlag**, v. 20, p. 1-11, 2011.

SPALATELU, C. Biotechnological valorization of whey. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, 2012.

STATSOFT. **Statistica for Windows. Version 8.0**. [S.I.]: StatSoft South America, 1999. CD-ROM.

STRECK, E. V. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS, Brasil, 2008.

SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAK, L.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121-128, 2014.

TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M. M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v. 8, p. 25–31, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAPAJÓS, P. B. A. **Estudo da mobilidade e da biodegradação de um óleo mineral em solos**. 2008. 205 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Civil), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

THOME, A.; REGINATTO, C.; CECCHIN, I.; COLLA, L. M. Bioventing in a Residual Clayey Soil Contaminated with a Blend of Biodiesel and Diesel Oil. **Journal Environmental Engineering**, v. 140, n. 11, p. 1-6, 2014.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TORRES, M. J.; PETROSELLI, G.; DAZ, M.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against Gram-positive foodborne pathogenic bacteria: UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 929-940, 2015.

TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.** 2002. Dissertação (Mestre em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

USEPA. **Microbial processes affecting monitored natural attenuation of contaminants in the subsurface.** EPA/540/S-99/001. Ada, Oklahoma, 1999.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v. 57, p. 1139-1150, 2004.

USEPA, U. S. **ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.** 1996. Method 3050B. Disponível em: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2011.

WEI, Y. H.; CHU I.M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 479-482, 2002.

WEISSENFELS, W.D.; KLEWER, H.; LANGHOFF, J. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Soils Particles: Influence on Biodegradability and Biototoxicity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 689-696, 1992.

WERNECK, M.; RODRIGUES, C. Transporte de Combustíveis no Brasil: Investimentos para o Abastecimento até 2020. **Revista Tecnológica**. 2013. Disponível em: <<http://www.ilos.com.br/web/transporte-de-combustiveis-no-brasil-investimentos-para-o-abastecimento-ate-2020/>> Acesso em: 30 de janeiro de 2016.

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 302-308, 2009.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 72, n. 1, p. 67-72, 1995.

ZOUBOULIS, A. I.; MOUSSAS, P. A. Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation. In: **Encyclopedia of Environmental Health**, London, p. 1037-1044, 2011.