



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO: BIOTECNOLOGIA

JESSÉ MALVEIRA GOMES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TENSOATIVO DA LINHAGEM BACTERIANA 358.1
ISOLADA DO PETRÓLEO**

Mossoró-RN

2014

JESSÉ MALVEIRA GOMES

**DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TENSOATIVO DA CEPA
BACTERIANA 358.1**

**Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semiárido – UFERSA, para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.**

**Orientadora: Prof^a Dra. Raphaela Vasconcelos
Gomes Barreto – UFERSA.**

Mossoró-RN

2014

O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade de seus autores

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

G633d Gomes, Jessé Malveira.

Avaliação do potencial tensoativo da linhagem bacteriana
358.1 isolada do petróleo / Jessé Malveira Gomes -- Mossoró,
2014.

46f.: il.

Orientador: Prof^a. Dra. Raphaela V. Gomes Barreto

Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade
Federal Rural do Semiárido. Pró-Reitoria de Graduação.

1. Petróleo. 2. Biorremediação. 3. Biosurfactante.
4. Petróleo. 5. Potencial tensoativo. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT/819-14

CDD: 665.5

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba
CRB-15/452

JESSÉ MALVEIRA GOMES

**DETECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TENSOATIVO DA CEPA
BACTERIANA 358.1**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto – UFRSA.

APROVADA EM: **06/08/2014**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto – UFRSA

Presidente

Prof^a Dra. Lidianne Leal Rocha – UFRSA

Primeiro Membro

Prof^a Dra. Emanuelle Fontenele Rabelo – UFRSA

Segundo Membro

A **Francisco Wellington Gomes**, meu pai, um homem honesto que sempre trabalhou bastante para criar melhores oportunidades de estudo para mim e possibilitou a minha formação.

A **Jecimar Malveira da Costa Gomes**, minha mãe, que tanto sonhou com esse momento, uma pessoa muito carinhosa e que sempre se sacrificou por mim.

A **Francisco Wellington Gomes Filho**, meu irmão, um jovem de caráter exemplar e justo, que sempre estive do meu lado e me ajudou a crescer bastante como pessoa.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve pronto a receber meus pedidos e perdões. Que sempre me proporcionou seguranças em minhas viagens de moto, para que eu chegasse em paz em casa.

Aos meus pais, Wellington Gomes e Jecimar Malveira, um casal muito responsável que fez de tudo por mim desde o começo de minha jornada. Por fazerem o possível para me sustentar em outra cidade para que eu pudesse cursar a faculdade. Dando muito apoio como sempre em meus estudos, o que sempre me motivou.

Ao meu irmão que, por causa dele, sempre tive um senso maior de responsabilidade e, com isso, sempre tive a obrigação comigo mesmo em ser um bom exemplo para ele. Por todo apoio moral que ele me deu.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança que sempre depositou em min. Por todas as reclamações e dicas que proporcionaram meu crescimento pessoal e profissional.

A todos ou meus queridos colegas de sala, que desde o começo me receberam de braços abertos e, sem hesitar, compartilharam comigo todo seu carinho e amizade. Tornaram-se minha família enquanto eu estava longe de casa. Por compartilharem de minhas alegrias e tristezas no decorrer de quatro anos de faculdade. Em especial meus “companheiros de estrada”, Eduardo, Klêydson e Ramon, que sempre juntos nos divertimos e aprendemos bastante.

Aos meus colegas do LEMIC, pela amizade e apoio, ao me ajudarem no desenvolvimento de meus experimentos, em especial à belíssima Louise Helena, minha grande amiga e companheira de aventuras.

A Klêydson e Rackel, que nesta última etapa da faculdade me ajudaram bastante, com os estudos para monografia e execução dos experimentos. Por me convidar pra almoçar em finais de semana que eu ficava na faculdade.

A minha namorada, Bruna, que esteve sempre comigo me dando total apoio, por me aguentar em momentos que nem eu me aguentava, pelo incentivo, pelos momentos de descontração.

A Prof^a Dra. Lidianne Leal Rocha, minha co-orientadora, me ajudou demais desde o começo da minha monografia, sendo para mim uma segunda Orientadora. Muito obrigado!

Ao Prof. Álvaro, da Química orgânica, que conseguiu as membranas de filtração a vácuo, sem as quais não teria conseguido concluir meus trabalhos. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy, que sempre foi um grande amigo e conselheiro, uma pessoa que tenho orgulho de ter conhecido e que mesmo sem ter nenhum vínculo com meu trabalho de conclusão de curso esteve disposto a me ajudar no que eu precisasse.

Ao Prof. M.Sc. Taffarel Melo Torres, que me ajudou a compreender o mundo da estatística contribuindo assim para um melhor desenvolvimento da minha monografia. Por sempre ceder seu laboratório quando meus experimentos necessitavam.

A Prof^a Dra. Emanuelle Fontenele Rabelo, pela ajuda com o óleo de imersão, que me propiciou ótimas fotos de minhas lâminas.

A toda minha família e amigos de Limoeiro do Norte que sempre estiveram comigo.

A Prof^a. Dra. Lidianne Leal Rocha e a Prof^a Dra. Emanuelle Fontenele Rabelo por aceitarem o convite para participarem da minha banca avaliadora.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Demore o tempo que for para você ver o que
você quer da vida e depois que decidiu não recue
ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te
dissuadir”.

(Zaratrusta do Nietzsche)

RESUMO

O petróleo é uma das fontes de energia mais requisitada pela população mundial. Este composto é formado em sua maioria por hidrocarbonetos, e estes estão em alguns casos associados a outros grupos moleculares, formando assim uma grande variedade em sua composição. Por conta de sua grande importância econômica mundial o petróleo é um produto bastante explorado e manipulado pelas indústrias petroquímicas e devido esta intensa exploração, existem riscos de contaminação ambiental, tanto em solo quanto em água. Para promover a remediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos do petróleo existem alternativas físicas e químicas, contudo estas são alternativas pouco eficientes, pois não promovem a mineralização do contaminante e em alguns casos levam a transformação deste em um produto mais tóxico. Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de biossurfactantes produzidos pela cepa 358.1, uma bactéria isolada do petróleo, que pode tornar-se uma alternativa promissora aos surfactantes químicos usados em biorremediação de áreas impactadas. Para comprovar a capacidade tensoativa do sobrenadante, a bactéria foi inoculada em Meio Mineral tendo como fonte de carbono a glucose. A suspensão foi centrifugada após 48h de fermentação sob agitação contínua e o sobrenadante isento de células foi submetido a testes do espalhamento do óleo e Índice de Emulsificação (E24). Nos testes de espalhamento do óleo, o sobrenadante apresentou uma ótima atividade com uma média de halo de ruptura de 6,2 cm e nos teste de E24 formou emulsões estáveis quando querosene, óleo diesel e gasolina foram usados, mostrando assim seu potencial na produção de um biossurfactante eficiente e com uma ótima ação mesmo sem ter sido purificado.

Palavras-chave: Biossurfactante, Biorremediação, Petróleo, Tensoativo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hidrocarbonetos alifáticos do petróleo.....	15
Figura 2 – Hidrocarbonetos aromáticos do petróleo.....	16
Figura 3 – Degradação e Biorremediação de composto do petróleo.....	18
Figura 4 – Representação esquemática de uma molécula de biossurfactante.....	20
Figura 5 – Solubilização de hidrocarbonetos e formação da micela do biossurfactante envolvendo hidrocarbonetos do petróleo.....	21
Figura 6 – Crescimento em placa da cepa 358.1.....	25
Figura 7 – Técnica da Microgota para verificação da concentração do inóculo de 358.1.....	26
Figura 8 – Determinação morfológica da cepa 358.1 como Gram negativa.....	27
Figura 9 – Propagação do inóculo da cepa 358.1 por 24h (A) e Caldo fermentativo da cepa após 48h (B).....	27
Figura 10 – Camada de petróleo bruto sobre água destila em placa de Petri (A), Controle negativo teste com água destilada (B), Controle positivo teste com Tween 80 (C), Repetições do teste com o sobrenadante da cepa 358.1 (D, E, F).....	29

Figura 11 - Representação gráfica dos dados obtidos com o teste de espalhamento do óleo, comparação entre os grupos: controle negativo (água destilada), controle positivo (Tween 80) e o sobrenadante isento de células (cepa 358.1). As barras referem-se à média dos halos formados e a barra de erros representa o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (a/b/c).....30

Figura 12 - Teste do espalhamento do óleo após tratamento térmico do sobrenadante da cepa 358.1.....31

Figura 13 - Representação gráfica dos dados obtidos com o teste de espalhamento do óleo, comparação entre os grupos: controle negativo (água destilada), controle positivo (Tween 80), sobrenadante isento de células (cepa 358.1) e o mesmo sobrenadante após ser tratado termicamente. As barras referem-se à média dos halos formados e a barra de erros representa o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (a/b/c).....32

Figura 14 - Fotos da atividade emulsificante do teste E24 para querosene (A), óleo diesel (B), gasolina (C) e glicerol (D).....33

Figura 15 - Representação gráfica dos dados obtidos com o teste Emulsificação (E24), comparação entre as fontes de hidrocarbonetos testadas: querosene, óleo diesel, gasolina e glicerol. As barras referem-se à média do índice de emulsificação e a barra de erros representa o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (a/b/c).....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
CMC	Concentração Micelar Crítica
E24	Atividade emulsificante após 24h
g	Grama
<i>g</i>	força centrífuga relativa
MEOR	<i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
rpm	rotações por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. PETRÓLEO E RISCO AMBIENTAL.....	16
2.2. BIORREMEDIAÇÃO.....	18
2.3. BIOSSURFACTANTES.....	20
3. OBJETIVOS DA PESQUISA	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA DA LINHAGEM.....	24
4.2. TESTE DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	24
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DO SOBRENADANTE	25
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DAS COLÔNIAS DE 358.1.....	26
5.2. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELA CEPA 358.1.....	28
5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DO SOBRENADANTE ISENTO DE CÉLULAS	29
6. CONCLUSÃO	37
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a fonte de energia mais utilizada e visada na atualidade. É composto em grande maioria por hidrocarbonetos e porções menores de óxido, compostos nitrogenados, sulfonados (BURGER, 1997; THOMAS, 2001; CORREA, 2003), do qual é formado pela decomposição de matéria orgânica sedimentada em bacias oceânica e continentais (MILLANI et al. 2000; THOMAS, 2001).

Por ser formado por hidrocarbonetos, e em alguns casos por compostos fenólicos, o petróleo tem uma grande capacidade de impactar negativamente o meio ambiente, mostrando-se tóxico para a vegetação nativa, animais e microbiota indígena (WEISMANN et al., 1998; MILLIOLI, 2009; TANG et al., 2011).

Em função de sua grande importância para os países, a exploração e o transporte de petróleo ocorre a todo o momento, e isso faz com que haja certos riscos de acidentes e, conseqüentemente, contaminação ambiental (La GREGA et al., 1994). O Brasil situa-se em um momento muito promissor em relação à indústria do petróleo com a descoberta do Pré-sal. Nesta nova realidade, o desenvolvimento de tecnologias inovadoras será necessário para obter um melhor processo de produção e manutenção do petróleo, causando o mínimo de dano ambiental (BARBI & DA SILVA, 2008; LIMA, 2008).

Em um desastre, com derrame de petróleo em ambientes aquático e terrestre, as técnicas utilizadas para remoção envolvem principalmente métodos físicos, utilizando redes para retenção da mancha de óleo, e químicos, com surfactantes para dissolução desses hidrocarbonetos. Mesmo com a minimização dos impactos causados, muitas vezes podem gerar subprodutos da degradação ainda persistentes e poluentes ao ambiente (ANDRADE et al., 2010).

Apesar desses métodos citados, a biorremediação é uma opção que vem se tornando bastante promissora por sua capacidade de mineralização de contaminantes do petróleo, tendo como produto final CO_2 e água, não formando subprodutos tóxicos ao meio ambiente, tornando-se assim uma alternativa ecologicamente viável (PHILLIPS et al., 2000). Isso é possível graças à capacidade de alguns micro-organismos, em especial as bactérias, de produzir metabólitos como os biosurfactantes, possibilitando assim a degradação e transformação de contaminantes, como o petróleo e seus derivados (ADENIYI & AFOLABI, 2002; VENOSA & ZHU, 2003; ZHANG et al., 2005).

Os biossurfactantes são metabólitos primordialmente microbianos, de natureza anfotérica, que têm a capacidade de biodisponibilizar o óleo contaminante presente no ambiente para que este sirva de fonte de energia para os micro-organismos (PORTER, 1994; BODOUR & MILLER-MAIER, 1998; BOGNOLO, 1999; PIRÔLLO, 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a produção de biossurfactantes pela cepa bacteriana 358.1 e sua eficiência nos teste de espalhamento do óleo e índice de emulsificação E24.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. PETRÓLEO E RISCO AMBIENTAL

O petróleo é um composto orgânico originado da sedimentação de matéria orgânica, tanto de animais como de vegetais que sofreram transformação química e bioquímica por milhares de anos dando origem, assim, a uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Essa matéria em decomposição que forma o petróleo é encontrada depositada em sedimentos nas bacias oceânicas e continentais (MILLANI et al. 2000; THOMAS, 2001; VAN HAMME et al., 2003). Por se tratar de uma substância complexa e heterogênea, as características do petróleo são influenciadas pelo ambiente em que este é encontrado. Logo, suas características variam em função da localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originam (VAN HAMME et al., 2003).

A mistura de hidrocarbonetos que constitui o petróleo é representada por cerca de 90% da fração total do óleo cru (Figura 1), a outra porção pode ser constituída de compostos nitrogenados, oxigenados e sulfonados (BURGER, 1997; THOMAS, 2001; CORREA, 2003). Dentre a complexa composição química dos hidrocarbonetos totais do petróleo, devemos dar destaque aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Figura 2), compostos altamente tóxicos e, conseqüentemente, prejudiciais ao meio ambiente quando liberados de forma inadequada (WEISMANN et al., 1998; MILLIOLI, 2009; TANG et al., 2011). Se tratando da poluição por derivados do petróleo podemos citar também, compostos tóxicos como os VOCs (Volatile Organic Compounds), óleos pesados, hidrocarbonetos alifáticos como o BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno) e pesticidas halogenados (RODRIGUEZ, 2006).

Figura 1 – Hidrocarbonetos alifáticos do petróleo (PEDROTI, 2007).

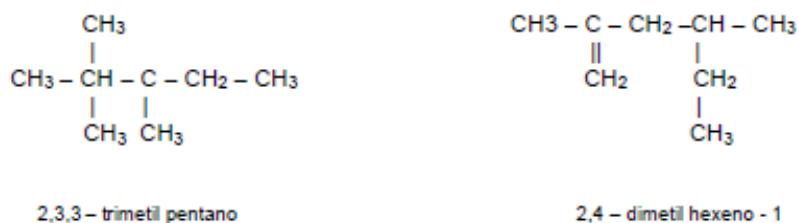
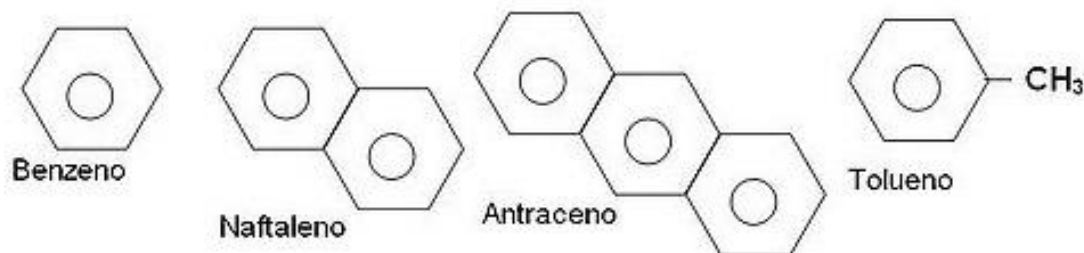


Figura 2 – Hidrocarbonetos aromáticos do petróleo (PEDROTI, 2007).



Com o avanço das indústrias petroquímicas, a possibilidade da utilização do petróleo e seus diversos derivados crescem com o decorrer do tempo, como plástico, tintas, corantes, solventes, detergentes, surfactantes e posteriormente os combustíveis. Sua exploração e utilização datam desde o século XIX, com os Estados Unidos iniciando a busca por petróleo e, posteriormente, em 1887 com a criação dos motores a combustão (THOMAS, 2001).

Por conseguir ser um produto tão requisitado e explorado mundialmente, sua extração e exploração são seguidos de risco de poluição ambiental, que pode ser causada por derrames acidentais de óleo no transporte por navios, problemas nas operações em refinarias e reservatórios, rompimentos de oleodutos e explosão de poços de perfuração (BURGER, 1997; PIRÔLLO, 2006).

Muitos processos de extração e desenvolvimento do petróleo envolvem sérios riscos ao meio ambiente, porém a sociedade moderna depende bastante dessa fonte de energia. Mesmo esta, representa uma fonte de energia que tem grande capacidade de agredir o meio ambiente, sendo uma das piores fontes de poluição, pois causa efeitos negativos ao solo e a água, de curta e longa duração (La GREGA et al., 1994).

Recentemente, no Brasil, foram relatados acidentes que promoveram a liberação e contaminação do petróleo no meio ambiente. Em 2011 houve um acidente no Rio Cubatão (São Paulo) e na Bacia de Campos (Rio de Janeiro), e em 2012 na Bacia de Santos (São Paulo) e Bacia de Campos (Rio de Janeiro). Esses acidentes somaram o derrame de aproximadamente 2,6 mil barris de petróleo o que resultou, conseqüentemente, em graves danos ao meio ambiente (CRUZ, 2012).

Em solo, o óleo bruto sofre modificações físico-químicas, como a adsorção das moléculas orgânicas do solo impedindo assim a ação microbiana, fazendo com que este produto seja de

difícil degradação (JOHNSEN et al., 2005; PIRÔLLO, 2006). A biodegradação ocorre através do metabolismo dos micro-organismos, do qual estes aproveitam contaminantes como fonte de carbono para obtenção de energia. Se tratando de um contaminante tão heterogêneo como o petróleo, vários compostos são formados para que sua degradação ocorra de forma completa (PEDROTI, 2007).

A biodegradação pode ser dividida em três categorias. A primeira ocorre quando o determinado substrato do metabolismo é degradado até forma somente água e dióxido de carbono; a segunda seria a biotransformação de compostos complexos em outros compostos mais simples; e o co-metabolismo, que se trata da degradação de um composto de forma incompleta, gerando um subproduto que não mais se encaixa em sua rota metabólica, ou seja, ocorre por ação de uma enzima produzida para outro propósito (GARNIER et al., 2000). Dado a grande capacidade microbiana em degradar compostos orgânicos, a biorremediação torna-se uma medida em potencial para tratar ambientes contaminados em especial por hidrocarbonetos do petróleo (ANDRADE et al., 2010).

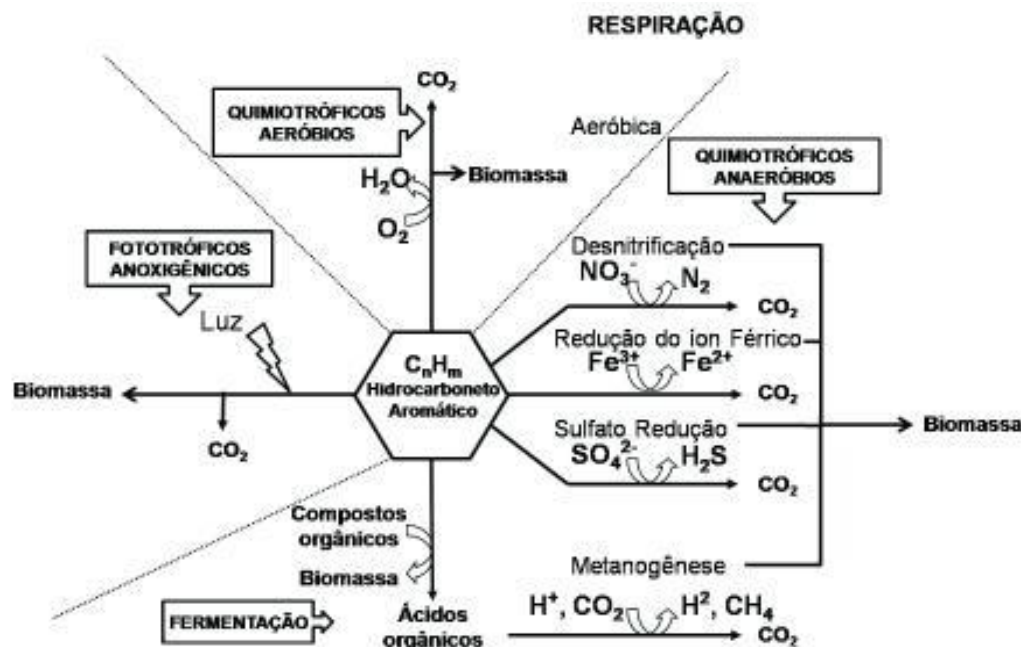
2.2. BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é um processo que vem sendo estudado desde a metade do século 20 (ZOBELL, 1946), porém esse termo e conceito só ganhou atenção no cenário mundial no final da década de 1980, com o derramamento de óleo do navio Exxon Valdez, em 1989, no Alasca. Deste então, o termo começou a ser tratado como uma crescente tecnologia com aplicações na limpeza e biodegradação de contaminantes perigosos, como o petróleo e derivados (HOFF, 1993).

Dentre os métodos físicos e químicos relacionados à limpeza de áreas contaminadas, a biorremediação surge como um método alternativo às formas convencionais de remoção ou degradação química de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo. Este processo baseia-se na capacidade metabólica dos micro-organismos em transformar uma grande variedade de compostos químicos (Figura 3), bem como os que compõem o óleo bruto, promovendo assim a biodegradação desses compostos (ADENIYI & AFOLABI, 2002; VENOSA & ZHU, 2003). Os micro-organismos usam os componentes do petróleo como fonte de carbono e energia para seu

metabolismo (ZHANG et al., 2005).

Figura 3 – Degradação e Biorremediação de composto do petróleo (DIAZ, 2004).



Este tratamento biológico de ambientes e solos contaminados tem como objetivo promover a transformação destes contaminantes em compostos menos nocivos ou até mesmo a sua mineralização, originando como produto final CO_2 , água e biomassa (PHILLIPS et al., 2000). A avaliação do grau de descontaminação irá depender da natureza e concentração do contaminante presente no ambiente, bem como as características físico-químicas, como tipo de solo, concentração salina da água, temperatura, pH e concentração de nutrientes em que está sendo aplicado o processo de biorremediação (ADENIYI & AFOLABI, 2002).

Para realizar a biorremediação, devemos nos apoiar em três princípios básicos, seriam eles: a existência de uma microbiota com potencial para degradar o contaminante existente; o quanto este contaminante está disponível para o ataque microbiano ou enzimático; e condições ambientais que favoreçam o desenvolvimento do agente biorremediador (ANDRADE et al., 2010).

Com base nestes aspectos citados, duas técnicas se destacam na biorremediação de ambientes poluídos, o bioaumento, que consiste na adição de linhagens microbianas selecionadas

e adaptadas a ambientes que apresentam contaminação, por conta disso tem capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo. A outra técnica utilizada, o bioestímulo, requer uma correção adequada das condições ambientais, possibilitando assim uma melhor adaptação dos agentes biorremediadores, como bactérias, na degradação do contaminante. Esta técnica consiste em manipular da melhor maneira possível os parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, salinidade e nutrientes, do qual dentre os nutrientes, o nitrogênio e o fósforo são os mais comumente utilizados (CUNHA, 2004; GAYLARD et al., 2005).

A inserção de biossurfactante em ambientes contaminados também é uma maneira de bioestímulo, uma vez que este composto tem a capacidade de solubilizar ou biodisponibilizar o contaminante para os agentes biorremediadores. Este processo promove assim uma eficácia na biodegradação do contaminante pelos micro-organismos indígenas (BOGNOLO, 1999; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.3. BIOSSURFACTANTES

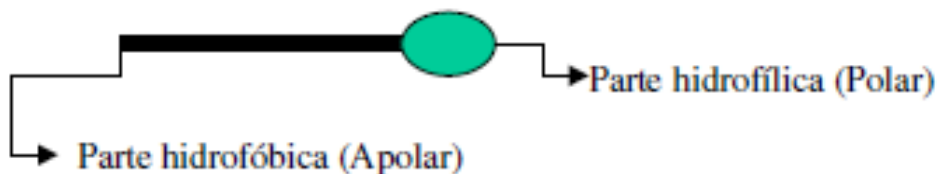
Os biossurfactantes são subprodutos do metabolismo microbiano (bactérias e fungos) e são classificados de acordo com sua natureza química. Normalmente, a produção de biossurfactantes está ligada ao crescimento aeróbio desses micro-organismos, os quais utilizam diversos substratos, encontrados no ambiente como fonte de energia. (BOGNOLO, 1999; PIRÔLLO, 2006). Dentre os substratos utilizados podemos incluir hidrocarbonetos do petróleo presentes na contaminação, açúcares e diversos resíduos agroindustriais (BOGNOLO, 1999; NITSCHKE & PASTORE, 2002; PIRÔLLO, 2006). Os biossurfactantes são de grande importância quando se tratam de surfactantes naturais e são divididos em seis classes principais: glicolipídios, lipossacarídios, lipoproteínas, lipopeptídios, fosfolipídios e ácidos graxos (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Por terem características ecologicamente aceitáveis, como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, os biossurfactantes tornam-se uma alternativa em potencial aos surfactantes químicos em várias aplicações (YIN et al., 2008), podendo ser amplamente utilizados em diversas indústrias, como a do petróleo, cosméticos, alimentos, farmacêutica, agrícola e de produtos de limpeza (BAO et al., 2009; DALVIN, 2011). Sua diversa aplicabilidade se reflete na

grande diversidade de micro-organismos e ambientes em que o biossurfactante pode ser produzido, formando uma grande variedade bioquímica deste composto, permitindo assim seu uso em áreas bastante específicas (ROSENBERG & RON, 1999).

Os biossurfactantes são compostos de moléculas anfipáticas, compreendendo uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica (Figura 4). Sua fração hidrofóbica é constituída por ácidos graxos saturados ou insaturados, hidroxilados ou não. Já sua porção hidrofílica pode ser constituída de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, polissacarídeos, ácidos carboxílicos, álcoois, ésteres, entre outros (PARREA et al., 1989; DESAI & BANAT, 1997). Por estas características bioquímicas, os biossurfactantes tem a capacidade de promover a diminuição da tensão superficial, definida pela força existente entre as superfícies de um líquido com o ar, levando a dispersão de compostos hidrofóbicos ou até mesmo sua total emulsão em solução aquosa (PORTER, 1994; BODOUR & MILLER-MAIER, 1998; BOGNOLO, 1999).

Figura 4 – Representação esquemática de uma molécula de biossurfactante (MILLIOLI, 2009).



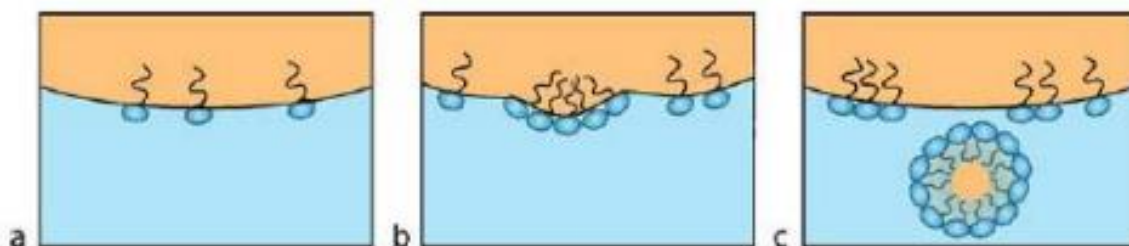
Por conta de suas características bioquímicas peculiares, há vários fatores que interferem na produção de biossurfactantes, parâmetros estes como, físicos, químicos, do meio em que os micro-organismos produtores estão inseridos (limitações nutricionais e fonte de carbono), temperatura, relação entre as proporções de carbono/nitrogênio e disponibilidade superficial do substrato específico (FIECHTER, 1992). Com isso, condições específicas refletiram em um produto com características específicas refletindo assim em sua atividade tensoativa (ADAMCZAK & BEDNARSKI, 2000; ABOUSEOUD et al., 2008).

Uma vez sintetizados, os biossurfactantes podem ser liberados para o meio ou podem permanecer na superfície da célula microbiana. Quando retidos na célula, ajudam no transporte de substratos insolúveis através da membrana, visto que tem a capacidade de se inserir na membrana celular, atuando assim no transporte de hidrocarbonetos insolúveis, aderência-liberação

das células em superfícies (ROSENBERG & RON, 1999; NITSCHKE & PASTORE, 2002). Ao serem liberados para meio, tem capacidade emulsionante e dispersante de hidrocarbonetos, que são insolúveis em água. Por conta dessas características, micro-organismos produtores de biossurfactantes tem capacidade de se desenvolver em substratos de natureza hidrofóbica ou apolar (ONGENA & JACQUES, 2008).

Com a capacidade de emulsionar e dispersar compostos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos, a biodegradação de ambientes, como o solo, por biossurfactantes pode ser vista através da dessorção do petróleo sorvido no solo e, conseqüentemente, pelo aumento da solubilidade dos mesmos quando os biossurfactantes são utilizados, tendo sua ação ainda mais eficiente quando atinge concentrações iguais a Concentração Micelar Crítica (CMC). Uma vez atingido o valor máximo da CMC, a tensão superficial e interfacial não sofrerá mais redução, mesmo que ocorra adição de mais biossurfactante no meio. A CMC é a menor quantidade de biossurfactante necessário para a formação de micelas, estas podem ser definidas por serem agregados moleculares com frações hidrofílicas e hidrofóbicas que se associam espontaneamente em meio aquoso, como ilustra a figura 5 (BOGNOLO, 1999).

Figura 5 – Solubilização de hidrocarbonetos e formação da micela do biossurfactante envolvendo hidrocarbonetos do petróleo (PERFUMO et al., 2010).



Visto a grande importância e risco ambiental que a extração e o beneficiamento do petróleo podem causar, deve-se utilizar de estratégias ecologicamente viáveis para tratar ambientes contaminados por com postos do petróleo. Deste modo os biossurfactantes, que são produtos obtidos a partir do metabolismo microbiano, tornam-se uma ferramenta promissora para tratamento de áreas contaminadas com petróleo, cujas metodologias físicas e químicas convencionais não são tão eficientes.

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção e eficiência dos biossurfactantes produzidos pela cepa 358.1 para uso futura em biorremediação.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar morfológicamente a linhagem estudada;
- Verificar a viabilidade da cepa quanto ao seu crescimento em meio mineral para produção de biossurfactante;
- Avaliar a atividade tensoativa do sobrenadante livre de células pelo método do espalhamento do óleo;
- Analisar se o biossurfactante produzido emulsifica diferentes fontes de hidrocarbonetos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA DA LINHAGEM

Para caracterização cultural, a linhagem em estudo, previamente isolada de amostras de petróleo pesado proveniente da Fazenda Belém, município de Icapuí – CE por FERREIRA (2013), foi cultivada por 24h em Agar Nutritivo a 30°C. Após este período, as colônias foram estudadas quanto ao seu tamanho, cor, presença de brilho, formato das bordas. As células foram submetidas à coloração pelo método de Gram para estudo da forma e análise da formação de arranjos.

4.2. TESTE DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

A produção de biossurfactantes foi realizada em Meio Mineral, composto por 10,0 g de glucose; 1,0 g de sulfato de amônio; 5,0 g de extrato de levedura; 6,0 g de fosfato dissódico; 3,0 g de fosfato de potássio monobásico; 2,7 g de cloreto de sódio e 0,6 g de sulfato de magnésio heptahidratado por litro de água destilada (MORÁN et al., 2000; PEREIRA et al., 2013), com modificações. Ao meio pronto foi acrescido 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes conforme Sar e Rosenberg (1983). O meio pronto foi esterilizado por filtração em membrana de 0,45 µm, para evitar precipitação de sais no caso de aquecimento. Após filtração o meio foi depositado em placas de Petri estéreis dentro da cabine de segurança biológica e banhadas por luz UV durante 30 min para garantir a esterilidade do meio.

Para o preparo do inóculo, uma colônia de 24h de crescimento em Agar Nutritivo foi subcultivada em 5 mL Meio Mineral, preparado conforme descrito anteriormente. A cultura foi cultivada sob agitação contínua de 150 rpm, a 30°C por 24h. A concentração do inóculo foi verificada pela contagem de células viáveis, com o uso da técnica da Microgota (ROMEIRO, 2007), com modificações. Esse processo foi feito em triplicata para ratificar a repetição dos valores obtidos.

Após 24h de crescimento, a suspensão celular em fase exponencial foi utilizada como inóculo, a uma proporção de 10% (v/v). A cultura foi incubada sob agitação contínua de 150 rpm,

a 30°C por 48h, após o que foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min para separação das células. O sobrenadante, desta forma, foi utilizado nos testes de atividade tensoativa. Todos os procedimentos foram feitos em triplicata.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DO SOBRENADANTE

A detecção de atividade tensoativa foi verificada pelo método de Iqbal, Khalid e Malik (1995) com modificações para o teste de emulsificação. Este teste consiste em avaliar a formação de emulsão dividindo o tamanho da camada emulsionada (espuma) pela camada total do líquido. O experimento foi feito adicionando-se 2 mL de sobrenadante isento de células em tubos de ensaio contendo 2 mL de Querosene, Gasolina comum, Diesel comum e Glicerol com agitação vigorosa em Vortex por 2 minutos. Este ensaio foi feito em duplicata com 6 repetições para cada hidrocarboneto. O outro teste de detecção foi o do espalhamento do óleo, descrito por Youssef et al. (2004) com modificações. O método consistiu em depositar petróleo bruto em aproximadamente 30 mL de água destilada em uma placa de Petri com diâmetro de 10 cm, após o que foram adicionados 200 µL de sobrenadante isento de células e o halo de ruptura no óleo bruto foi medido e comparado com o controle negativo (água destilada) e o controle positivo (Tween 80). Os testes foram realizados em triplicata.

A fim de avaliar a capacidade tensoativa do sobrenadante em altas temperaturas, este foi submetido a um tratamento térmico de 121°C por 15 min, o mesmo tratamento utilizado para esterilização, e posteriormente submetido ao teste de espalhamento do óleo.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

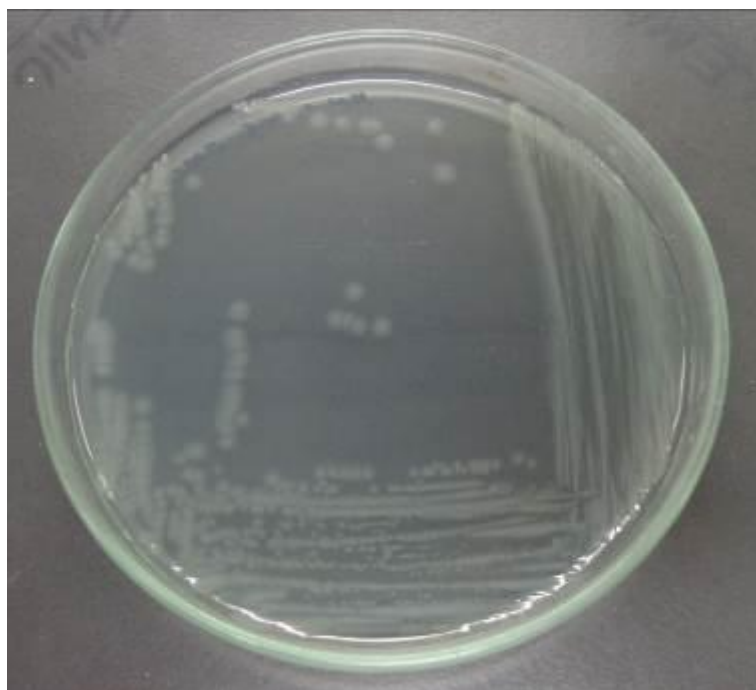
Para análise dos dados, foi primeiramente executado um teste de normalidade Shapiro-Wilk com o nível de significância de 5% ($P < 0,05$) para determinar se os dados seguiam uma curva normal. Foi verificado que os dados eram normais, logo usou-se uma ANOVA associado a um teste de Tukey, ambas com o nível de significância de 5% ($P < 0,05$) para verificar se há diferença significativa entre os grupos testados, tanto nos teste de espalhamento do óleo quanto no E24. Para o teste estatístico foi usado o programa PAST (HAMMER et al., 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DAS COLÔNIAS DE 358.1

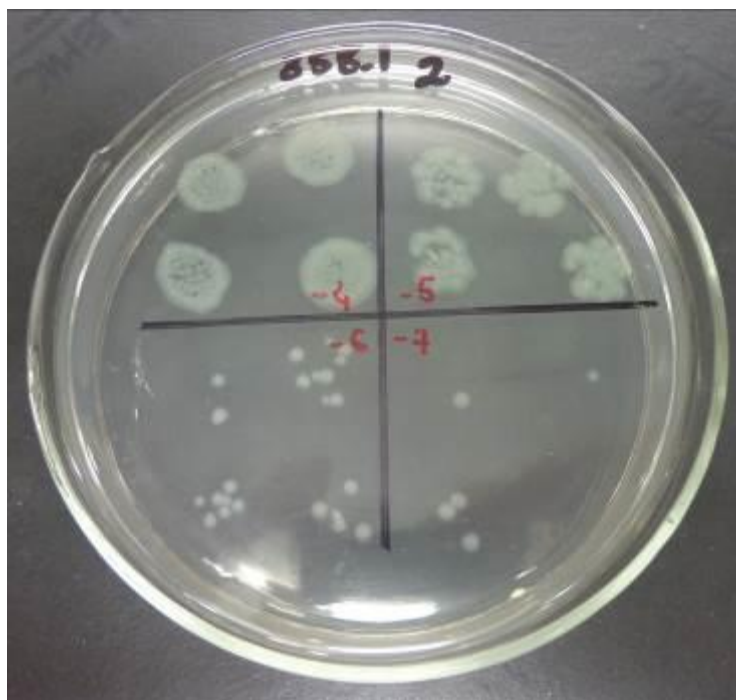
A cepa bacteriana 358.1 apresentou colônias mucóides, circulares, com bordas uniformes e de aproximadamente 2mm de diâmetro, como mostra a Figura 6.

Figura 6 – Crescimento em placa da cepa 358.1.



Através da técnica da microgota foi possível padronizar o número de células inicial do inoculo para $1,2 \times 10^8$ células/ml de Meio Mineral.

Figura 7 – Técnica da Microgota para verificação da concentração do inóculo de 358.1.



De maneira paralela a verificação da concentração bacteriana, a técnica de Gram foi utilizada para verificar o tipo de parede celular da cepa 358.1. A Figura 8 mostra que a determinada cepa é uma bactéria Gram negativa e em forma de bastonete. Como relatado por Gouveia e colaboradores (2003), populações bacterianas Gram negativas podem ter uma determinada vantagem sobre outras populações quando estas estão em competição por compostos hidrofóbicos, os quais são predominantes em ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo.

Estudos de caracterização e purificação de biossurfactantes com potencial tensoativo revelam que cepas como *Pseudomonas* sp. 2B (APARNA et al., 2012) e *Sphingobacterium* sp. (BURGOS, et al., 2011) são caracterizadas também como Gram negativas, concordando assim com os resultados encontrados para linhagem 358.1. Porém no trabalho de Bueno (2008), que isolou e caracterizou micro-organismos de amostras de solo contaminadas por hidrocarbonetos, a maiorias de seus isolados produtores de biossurfactantes eram Gram positivos.

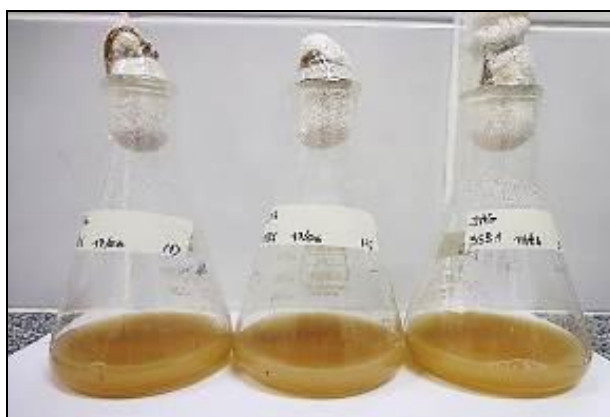
Figura 8 – Característica morfológica da linhagem 358.1 Lâmina corada pelo método de Gram e fotografada em microscópio óptico com aumento de 1000 x.



5.2. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELA CEPA 358.1

A linhagem em estudo atingiu a fase exponencial de crescimento a partir de 18h em meio mineral e teve a produção de biossurfactante detectada a partir de 48h de cultivo a 30°C sob agitação de 150 rpm (Figura 9).

Figura 9 – Aspecto do crescimento do inoculo inicial e durante os experimentos em Meio Mineral para produção de biossurfactantes.

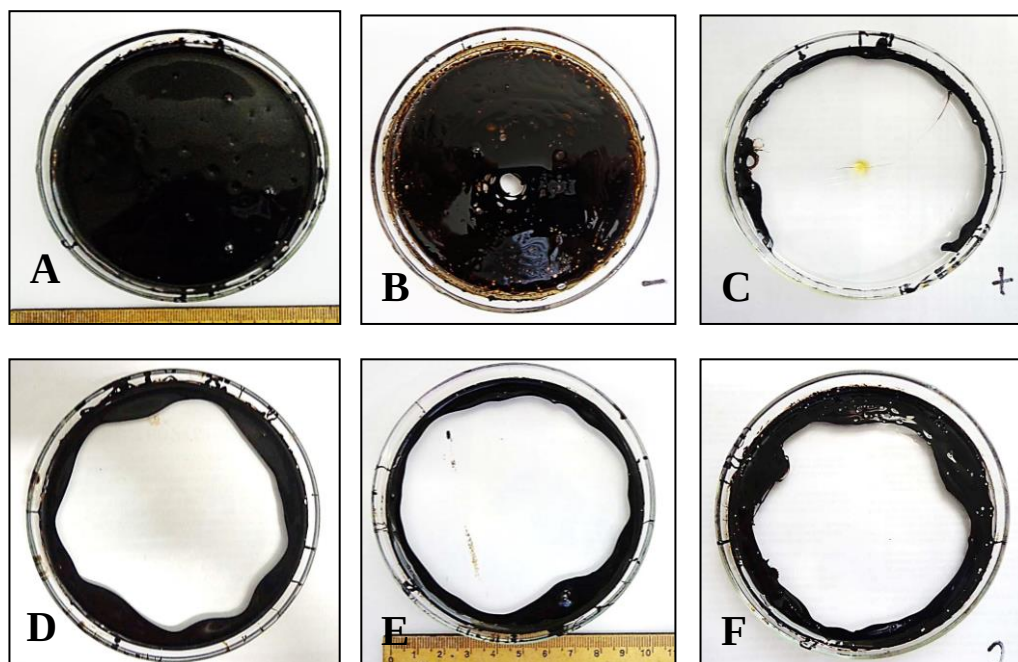


Bueno (2008) em seu estudo sobre bactérias produtoras de biossurfactantes constatou que uma maior produção deste composto encontrava-se após 72h de crescimento de modo diretamente proporcional ao crescimento bacteriano, diferentemente do tempo fermentativo usado para a cepa 358.1, onde a cultura teve seu desenvolvimento por 48h e obteve ótimos resultados nos teste de avaliação da atividade tensoativa. A fonte de carbono usada no Meio Mineral para a fermentação da cepa 358.1 foi a glucose. Diferentemente, Bueno (2008) em seu trabalho, analisou diferentes fontes de carbono com o objetivo de obter uma melhor produção de biossurfactante e melhor atividade tensoativa e concluiu que com a sacarose encontrou os melhores resultados. Em seu trabalho sobre otimização do processo de produção de biossurfactantes, Pereira (2013), variou fontes de nitrogênio. Seus resultados corroboraram com os obtidos em nosso trabalho, cuja fonte melhor de nitrogênio foi o sulfato de amônio.

5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DO SOBRENADANTE ISENTO DE CÉLULAS

A atividade tensoativa do sobrenadante isento de células foi avaliada utilizando a técnica de espalhamento de óleo. A capacidade do biossurfactante estudado para emulsificar hidrocarbonetos foi estudada pelo método E24. Conforme observado na Figura 10, os resultados foram bastante promissores, visto que os halos de abertura do óleo para o sobrenadante ainda bruto foram significativos ($p < 0,05$), tomando quase toda a superfície testada. Importante destacar ainda que o biossurfactante em estudo foi tão eficiente quanto o controle positivo realizado com um produto químico puro, Tween 80.

Figura 10 – Camada de petróleo bruto sobre água destilada em placa de Petri (A), Controle negativo teste com água destilada (B), Controle positivo teste com Tween 80 (C), Repetições do teste com o sobrenadante da cepa 358.1 (D, E, F).

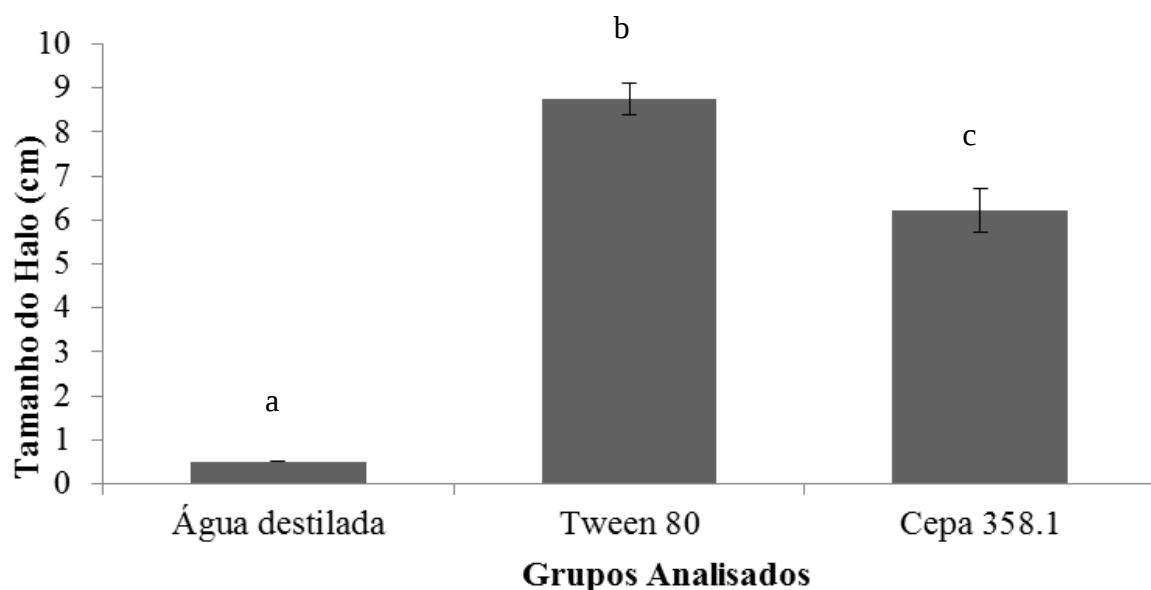


Jazeh e colaboradores (2012) verificaram o potencial tensoativo de 160 isolados, dos quais duas cepas de *Bacillus sp.* resultaram em potenciais produtoras de biosurfactantes. Dentre seus métodos de detecção, o espalhamento do óleo foi usado, porém seus resultados foram comparados apenas com um controle negativo, água destilada, diferentemente dos testes feitos com a cepa 358.1, que analisou sua eficiência equivalente a um produto químico. Uma vez que comparar também com um controle positivo, como foi feito neste trabalho, expressa além da presença do biosurfactante no sobrenadante, a sua eficiência, quando comparado a um surfactante químico (Tween 80).

Youssef e colaboradores (2004) avaliaram três métodos de detecção de biosurfactantes, sendo um deles o teste de espalhamento do óleo, do qual em seus resultados mostraram que este era eficiente na detecção de compostos tensoativos como os biosurfactantes, assim como foi mostrado neste estudo com a cepa 358.1. Nos testes de espalhamento do óleo, a cepa 358.1 mostrou halos de ruptura em média de 6,2cm (Figura 11). Com isso, halos de ruptura

maiores que 40% na superfície de petróleo são considerados resultados promissores para cepas produtoras de biossurfactantes (YOUSSEF et al., 2004; BARRETO, 2011).

Figura 11- Medidas em cm dos halos obtidos após adição do sobrenadante livre de células sobre a camada de petróleo. Controle negativo (água destilada), controle positivo (Tween 80) e o sobrenadante isento de células (cepa 358.1). As barras referem-se à média dos halos formados e a barra de erros representa o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (a/b/c).



É possível notar visivelmente no gráfico da Figura 11 que há uma diferença significativa entre todos os grupos, contudo a diferença entre o sobrenadante da cepa 358.1 (c) apesar de significativa é pequena quando comparado diretamente com o controle positivo, o surfactante químico Tween 80 (b). Isso reflete o grande potencial do biossurfactante produzido pela cepa 358.1 não purificado, para ser utilizado como alternativa ao surfactante químico, principalmente na biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Afshar e colaboradores (2008) avaliaram a eficácia de métodos de detecção de biossurfactantes produzidos por bactérias isoladas de áreas de escavação petrolífera. Não

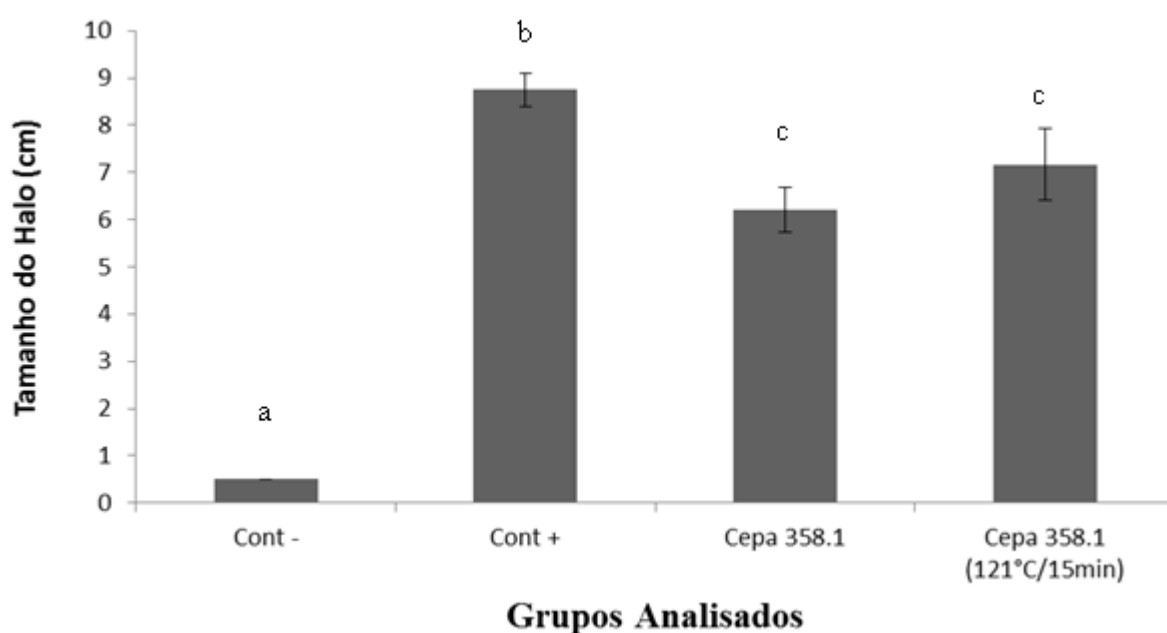
obstante, dentre os seus métodos de avaliação, o teste do espalhamento do óleo foi escolhido como o método mais simples, rápido e de reposta precisa, uma vez que os resultados corresponderam com os do teste de tensão superficial Du Nouy, mostrando que o tamanho do halo formado no espalhamento do óleo é inversamente proporcional a tensão superficial. Estes resultados reforçam os obtidos para a linhagem 358.1, uma vez que os halos de rompimento da camada de óleo causados pelo sobrenadante da cepa foram significantes.

Após a análise dos resultados encontrados, resolveu-se avaliar a termoestabilidade da atividade tensoativa do sobrenadante da cultura de 358.1. Para isso, o sobrenadante bruto foi submetido a um tratamento térmico de 121°C por 15 min. Após o resfriamento e realização novamente do teste de espalhamento do óleo, obteve-se o mesmo resultado (Figura 12 e 13), o que amplia as possibilidades de aplicação deste bioproduto mesmo em condições de temperaturas mais extremas. Estes resultados condizem com os de Barreto (2011), que mesmo após ter sido aquecido, o sobrenadante manteve sua atividade tensoativa.

Figura 12 – Teste do espalhamento do óleo após tratamento térmico do sobrenadante da cepa 358.1.



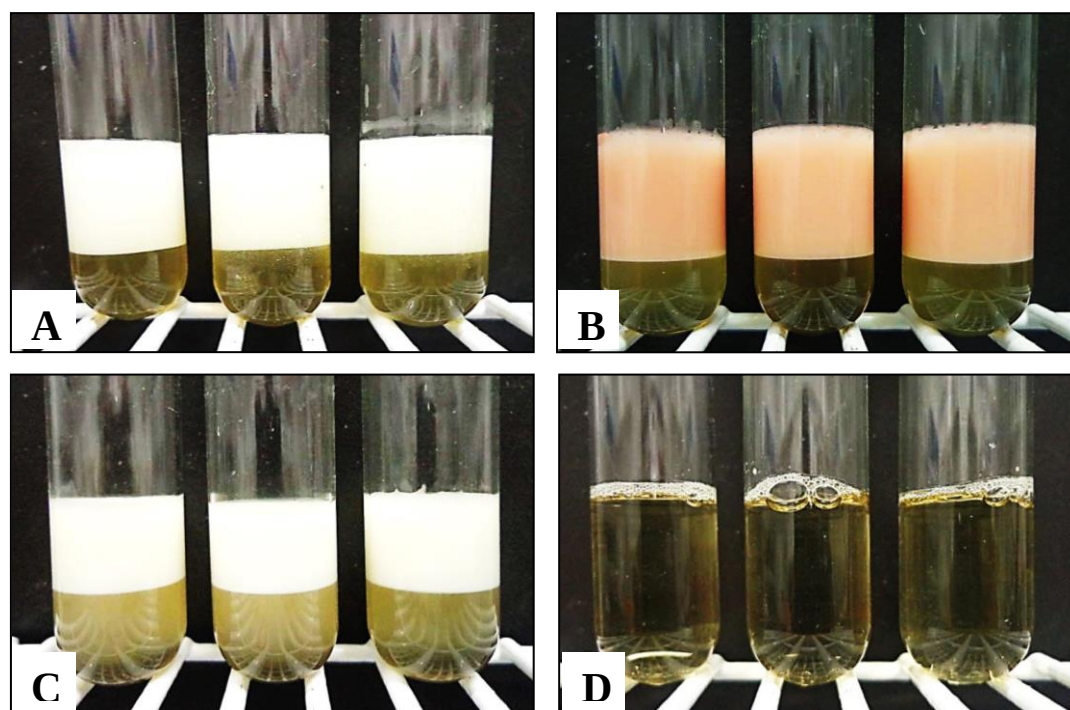
Figura 13 - Comparação dos tamanhos dos halos antes e após o tratamento térmico do sobrenadante de 358. Controle negativo (água destilada), controle positivo (Tween 80), sobrenadante isento de células (cepa 358.1) e o mesmo sobrenadante após ser tratado termicamente. As barras referem-se à média dos halos formados e a barra de erros representa o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (a/b/c).



Outro parâmetro que refletiu na avaliação da atividade tensoativa foi a verificação da potencial emulsificante do sobrenadante isento de células. A emulsificação é uma propriedade de alguns compostos anfipáticos de promover a dispersão de substâncias imiscíveis, através de microgotas de emulsão (VALPUESTA, 2008). Para detectar a avaliação da capacidade emulsificante da cepa 358.1, foi usado o teste proposto por Iqbal e colaboradores (1995) com modificações, no qual 2 mL de sobrenadante foram adicionados a 2 mL de diferentes fontes de hidrocarbonetos (querosene, óleo diesel, gasolina e glicerol) e o índice de emulsificação foi medido após 24h. Conforme a Figura 14, verificamos que foram formadas emulsões nos

hidrocarbonetos teste querosene, óleo diesel, gasolina e glicerol. Esses resultados mostram a importância de uma biomolécula com capacidade emulsificante, reforçando assim as possibilidades de aplicação desta substância no ambiente que não se encontra normalmente poluído com apenas um composto (VOLKERING et al., 1995) .

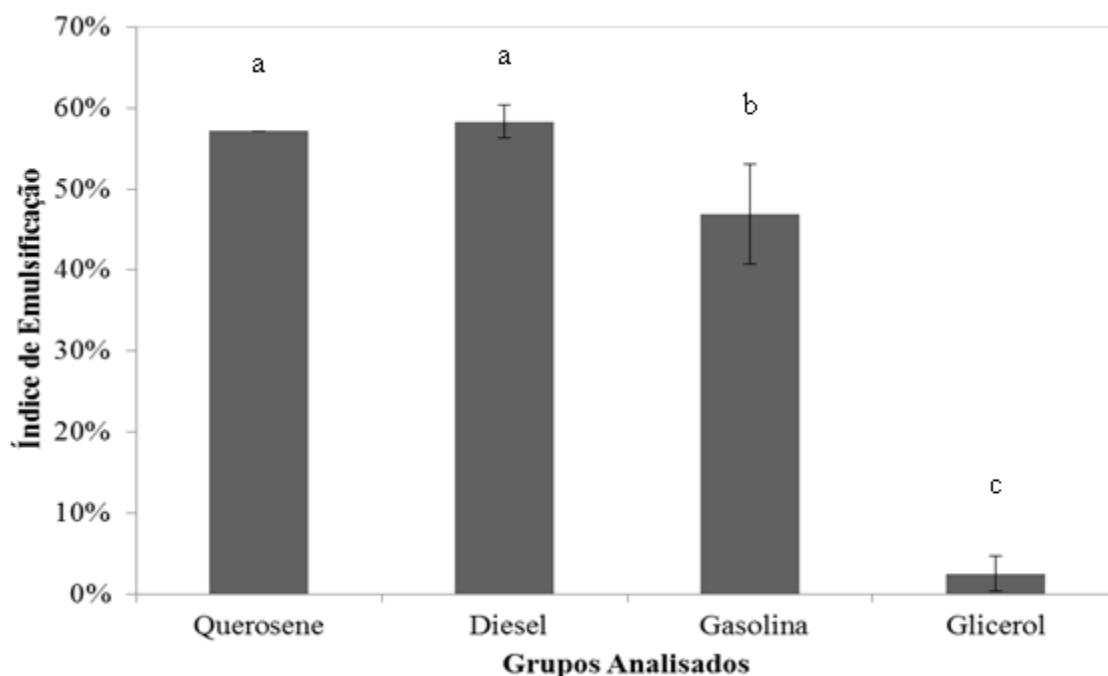
Figura 14 – Fotos da atividade emulsificante do teste E24 para querosene (A), óleo diesel (B), gasolina (C) e glicerol (D).



Em seu estudo sobre métodos de detecção de biossurfactantes produzidos por micro-organismos isolados de solo contaminado com hidrocarbonetos, Plaza e colaboradores (2006) avaliaram o índice de emulsificação em diferentes fontes de hidrocarbonetos, onde uma delas era o óleo diesel. Porém em seu trabalho, a avaliação do índice de emulsificação constou de um teste com 7 mL de sobrenadante adicionados a 3 mL de óleo diesel obtendo resultados com variação de 10 – 80%, diferentemente dos dados obtidos com o sobrenadante da cepa 358.1, que

usou uma concentração de 1:1 de sobrenadante para óleo diesel e formando emulsões estáveis. O sobrenadante produzido pela cepa 358.1 obteve resultados com uma média de 57%, 58%, 47% e 3% para querosene, óleo diesel, gasolina e glicerol, respectivamente (Figura 15), mostrando índices estatisticamente melhores que os obtidos no trabalho anteriormente citado.

Figura 15 - Índice de emulsificação (%) para diferentes fontes de hidrocarbonetos testadas: querosene, óleo diesel, gasolina e glicerol. As barras referem-se à média do índice de emulsificação e a barra de erros representa o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (a/b/c).



De acordo com Bosch e colaboradores (1988), uma emulsão é declarada estável se seu valor de E24 for acima de 50%. De acordo com o gráfico da Figura 12, podemos notar que o sobrenadante da cepa 358.1 conseguiu obter índices de emulsificação de quase 60% nos tratamentos com querosene e óleo diesel, logo estes não apresentaram diferença significativa.

Estes resultados se comparam aos alcançados por Pirrolo (2006), no qual adquiriu índices de emulsificação com querosene e óleo diesel acima de 66%. Em contrapartida, Esmeraldo (2010) ao estudar a surfactina, biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, não conseguiu eficiência nos testes de E24 feitos com querosene, apenas com n-hexadecano, óleo de motor e óleo de soja. No teste de emulsificação feito com a gasolina, seu valor médio foi de quase 50%, apesar de não atingir esta margem, sua emulsão ainda era estável. No tratamento com glicerol praticamente não houve emulsão e o mínimo de emulsão que se formou desapareceu em um intervalo de dois a três dias. Todos os tratamentos, menos o glicerol, mantiveram-se estáveis mesmo após 5 dias da realização dos testes.

Pereira e colaboradores (2013), em seu estudo sobre otimização e caracterização da produção de biossurfactantes produzidos por três cepas de *Bacillus*, dentre suas avaliações a cepas obtiveram índice de E24 entre 39 – 53% e em seu teste para recuperação melhorado do petróleo por micro-organismos (MEOR), obtiveram resultados promissores. Uma vez que estes valores foram menores que os alcançados com o sobrenadante da linhagem 358.1, pode-se sugerir que a bactéria estudada trata-se de uma forte candidata a ser explorada para produção de tensoativos em larga escala. Estas biomoléculas poderão, em um futuro próximo, serem testadas para utilização na indústria e em processos de biorremediação.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, a linhagem 358.1 mostrou-se bastante promissora para a produção de biossurfactantes, sendo este um tensoativo com propriedades semelhantes aos surfactantes químicos, mesmo sem ter sido purificado. Estas características valorizam e estimulam estudos mais aprofundados dessa linhagem, visto que os bioprodutos microbianos são ecologicamente amigáveis e menos poluentes que seus similares artificiais. A atividade tensoativa bastante eficiente do sobrenadante não tratado favorece a questão econômica do bioproduto, pois mesmo diluído e não purificado, apresentou resultados equivalentes ao surfactante químico purificado. Estes resultados abrem novas possibilidades de estudos, no campo da Biotecnologia, para a microbiota nativa do petróleo.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar por meio de técnicas moleculares a linhagem 358.1.
- Caracterizar quimicamente o biossurfactante produzido pela cepa 358.1.
- Avaliar a estabilidade do tensoativo produzido pela cepa 358.1 quanto a oscilações de pH e salinidade.
- Estabelecer uma metodologia para obter melhor respostas quanto às condições de crescimento e produção do tensoativo da cepa 358.1
- Promover ensaios de microcosmo para teste de Biorremediação e MEOR

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, vol. 223, p. 143–151, 2008.

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

ADENIYI, A. A.; AFOLABI, J. A. Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in Lagos metropolis. **Environmental International**, vol. 28, p. 79-82, 2002.

AFSHAR, S.; LOTFABAD T. B.; ROOSTAAZAD R.; NAJAFABADI A. R.; NOGHABI, K. L. Comparative approach for detection of biosurfactant-producing bacteria isolated from Ahvaz petroleum excavation areas in south of Iran. **Annals of Microbiology**, Tehran, Iran, v. 58, n. 3, p.555-560, jun. 2008.

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

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

BAO, M. T.; KONG, X. P.; JIANG, G. C.; WANG, X. L.; LI, X. M. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. **Journal of Petroleum Science Engineering**, vol. 66, p. 42–46, 2009.

BARBI, F. C.; DA SILVA, A. L. P. O Petróleo do Pré-sal: os desafios e as possibilidades de uma nova política industrial no Brasil. **Pesquisa & Debate. Revista do Programa de Estudos Pós-Graduados em Economia Política**. ISSN 1806-9029, v. 19, n. 2 (34), 2008.

BARRETO, R. V. G. **Prospecção de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solo do manguezal**. 2011. 147 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BOSCH, M.P., ROBERT, M., MERCADE, M.E., ESPUNY, M.J., PARRA, J.L., GUINEA, J. Surface-active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**. v. 25, p. 208–211, 1988

BODOUR, A. A.; MAIER, M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. vol. 32, p. 273-280, 1998.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, vol. 152. p. 41-52, 1999.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

BURGER, R. M. H. Oil Spill. **Rutgers University Press**. New Jersey. P. 261, 1997.

BURGOS, D. C. *et al.* Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 1, p. 195–204, set. 2011.

CORREA, O. L. S. **Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2003.

CRUZ, J. F. **Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do Petróleo e Ambiental) – Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2012.

CUNHA, C. D. **Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. 2004, 176f. Tese Doutorado. Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DESAI, J. D. e BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology Molecular Biology Review**, 61: 47-67, 1997.

ESMERALDO, F. S. **Influência da temperatura na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* lami005**. 2010. 42 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FERREIRA, C. M. de O. **Produção de compostos tensoativos por micro-organismos isolados de amostras de petróleo**. 2013. 45 f. Monografia (Especialização) - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró - RN, 2013.

FICHTER, D. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v.10, p.208-216, 1992.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, vol. 34, p. 36-43, 2005.

GARNIER, P. M.; AURIA, R.; AUGUR, C. & REVAH, S. Metabolic degradation of methyl tert-butyl ether by a soil consortium: effect of components present in gasoline. **Journal of General and Applied Microbiology**, 46:79-84, 2000.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 30 ed, Pernambuco, p.39-45, jan. 2003.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, p. 1-9. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

HOFF, R. Z. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, n. 9, p. 476–481, 1993.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactants by gamma ray-induced mutant *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 21, p. 176-179, 1995.

JAZEHI, M. G.; FORGHANI, F.; OH, D.-H. Biosurfactan Production by *Bacillus* sp. Isolated from Petroleum Contaminated Soils of Sirri Island. **American Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.

JHONSEN, A. R. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, vol. 133, p. 71- 84, 2005.

LA GREGA, M. D.; BUCKINGHAM, P. L.; EVANS, J. C. **The Environment resource management group: hazardous waste management**. 1 ed. Singapore: Mc Graw- Hill, p.1146-1994.

LIMA, P. C. R. Os desafios, os impactos ea gestão da exploração do pré-sal. **Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados. Consultoria Legislativa**, 2008.

MILIOLLI, V. S. **Avaliação da potenciabilidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2009. 193 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

MILLANI, E. J.; BRANDÃO, A. S. L.; ZALÁN, P.V.; GAMBOA, P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Revista Brasileira Geofísica**, vol. 18, Nº 3 São Paulo. 2000.

MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; Sineriz F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v.(11), p.65-71 2000.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. “Biossurfactantes: propriedades e aplicações”. **Quimica Nova**, vol. 25, Nº 5, p. 772-776, 2002.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, vol. 16, p. 115-125, 2008.

PARREA, J.L., GUINEA, J., MANRESA, M.A. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, **Surfactants and Detergents Technical**. JACOS, 66 (1), 1989.

PEDROTI, Giselle Intra. **Ensaios de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

PEREIRA, J. F. B. *et al.* Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, set. 2013.

PERFUMO, A. SMYTH T.J.P., MARCHANT R. & BANAT, I.M. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, Timmis K.N. Ed., p. 1501-1512, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 2010.

PHILLIPS, THERESA M., DICKSON LIU, and ALAN G. SEECH. Bioremediation in field box plots of a soil contaminated with wood-preservatives: a comparison of treatment conditions using toxicity testing as a monitoring technique. **Water, air, and soil pollution** v.121, p.173-187, 2000

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro – SP. 2006.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 50, n. 1, p. 71–77, jan. 2006.

PORTER, M. R.; Handbook of surfactants. **Blackie Academic & Professional**. Second Edition. 324p. 1994.

RODRIGUEZ, C.P.M. **A influencia das Caracteristicas dos Solos na Remediacao de Solos Contaminados Atraves de Processos Oxidativos Avancados com Persulfato e Reagente de Fenton**. Universidade de Sao Paulo, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. 2007.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.154, 1999.

SAR, N.; ROSENBERG, E. Emulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* Strains. **Current Microbiology**, vol. 9, p. 309-314, 1983.

TANG, JINGCHUN et al. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Environmental Sciences**, China, p. 845-851, 2011.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de engenharia do petróleo**. Petrobras. Interciência, Rio de Janeiro, p.273, 2001.

VALPUESTA, R. R. F. **Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-prima renovável e de baixo custo**. Dissertação de Mestrado-EQ/UFRJ. 104f. 2008.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67 (4) p.503-549. 2003.

VENOSA, A. D., ZHU, X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. **Spill Science and Technology Bulletin**, vol. 8, p. 163-178, 2003.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; ANDEL, J. G. V.; RULKENS, W. H. Influence of non ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 1699-1705. 1995.

WEISMANN, et al. Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media. **Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series**, vol. 1, p. 20-25, 1998.

YIN H., QIANG J., et al. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil containing wastewater. **Process Biochemistry**, vol. 11, p. 367–373, 2008.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCLNERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactants production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.339-374, 2004.

ZHANG, G.; WU, Y.; QIAN, X.; MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Hangzhou, vol.6, N° 8, p. 725-730, 2005.

ZOBELL, C. E. Action of Microorganisms on hydrocarbons. **Bacterial Rev.** v.10, p.1-49, 1946.