

**Universidade de Passo Fundo**  
**Faculdade de Engenharia e Arquitetura**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental**

**Thaís Strieder Machado**

**Produção de biossurfactantes bacterianos em solos  
utilizando bioaumentação e bioestimulação**

**Passo Fundo**

**2018**

**Thaís Strieder Machado**

**Produção de biossurfactantes bacterianos em solos  
utilizando bioaumentação e bioestimulação**

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 a obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Professora Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla.

**Passo Fundo**

**2018**

**Thaís Strieder Machado**

**Produção de biossurfactantes bacterianos em solos  
utilizando bioaumentação e bioestimulação**

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 da aprovação: 20 de abril de 2018.

Membros da banca examinadora:

Prof. Dra. Luciane Maria Colla  
Orientadora

Prof. Dr. Antônio Thomé  
Universidade de Passo Fundo – UPF

Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr  
Universidade de Passo Fundo – UPF

Prof. Dra. Helen Treichel  
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

**Passo Fundo**

**2018**

*Dedico este trabalho aos meus pais Protásio e Bernadete,  
e a minha irmã Bruna,  
pelo apoio incondicional de sempre.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, pela força, determinação e saúde, que sempre me proporcionou para a concretização dos meus objetivos.*

*Aos meus pais Protásio e Bernadete, os meus maiores exemplos, pelos conselhos, incentivo e amor, que sonharam junto comigo e não mediram esforços para a realização deste.*

*A minha irmã Bruna, com quem posso contar com a amizade e o amor mais verdadeiro, pelas conversas de distração que minimizaram a saudade, você é meu maior orgulho.*

*Ao meu amor Felipe, pelo ombro amigo, por estar ao meu lado em todos os momentos com uma palavra carinhosa, pela compreensão, serenidade e amor durante o mestrado.*

*A minha orientadora Dr. Luciane, pelo carinho, pela paciência, pelas oportunidades que me proporcionou e por seu fundamental empenho a este trabalho, tens a minha eterna admiração.*

*Ao grupo de pesquisa envolvido na colaboração experimental deste trabalho, pela amizade, companheirismo e inúmeras análises realizadas, Andressa, Ângela e Kimberly, sem vocês não teria chegado até aqui.*

*Aos laboratoristas e acadêmicos, envolvidos no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos e no Laboratório de Biotecnologia Ambiental, em especial a Ana e a Marilda.*

*A Universidade de Passo Fundo e ao PPGEng por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho e pelo incentivo à ciência, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!*

*“As nuvens sempre passam.  
Podem ser nuvens claras ou escuras, mas sempre passam.  
Talvez tenha que chover uma tempestade, mas ela também passa.  
Compreenda que você não é a nuvem, você é o céu”.*

*Sri Prem Baba*

*“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*

## RESUMO

Apesar dos constantes progressos sobre o entendimento dos mecanismos referentes aos efeitos dos biossurfactantes em processos de biorremediação de resíduos oleosos, há uma lacuna na literatura no que tange à mensuração da produção *in situ* destes compostos. Sabe-se da influência positiva dos biossurfactantes, mas também há casos em que nenhum efeito ou efeitos negativos foram observados. Portanto, é necessário ampliar os estudos em locais contaminados com relação ao comportamento microbiano autóctone quando realizada a bioaumentação e bioestimulação para produção de biossurfactantes, bem como a mensuração desta produção no solo, e a sua atuação na biodegradação do contaminante. Este estudo teve como objetivo estimular e mensurar a produção de biossurfactantes *in situ* durante a biorremediação de óleo diesel em solo argiloso através da bioaumentação e da bioestimulação. Inicialmente, produziu-se surfactina através de fermentação submersa utilizando a bactéria *Bacillus methylotrophicus* e soro de leite como meio de cultivo, para padronizar as metodologias de mensuração de biossurfactantes em meio aquoso. O biossurfactante produzido foi adicionado em solo e realizados estudos de padronização de metodologia de extração do biocomposto do solo e a sua mensuração. Em uma segunda etapa, estudou-se a influência da adição de surfactina parcialmente purificada dos meios de fermentação, sobre o crescimento de microrganismos em tubos e sobre a liberação de CO<sub>2</sub> dos microrganismos autóctones do solo. Na terceira fase do estudo, realizou-se a biorremediação em solo contaminado com 20% de óleo diesel, utilizando como estratégias para estimular a produção *in situ* de biossurfactantes, a bioaumentação e bioestimulação. A biorremediação foi realizada por 60 dias sendo avaliadas as respostas da taxa de remoção do contaminante, a avaliação da degradação e da produção de biossurfactantes *in situ* através de espectros de infravermelho, além da mensuração dos biossurfactantes *in situ* em função da redução da tensão superficial. Foram produzidos biossurfactantes na quantidade de interesse, utilizados para a elaboração das curvas padrão pela tensão superficial e método de Biureto para avaliar a produção de biossurfactantes *in situ*. Foi possível realizar a curva padrão de Biureto para determinação de surfactina, no entanto, quando esta foi adicionada ao solo e realizada a extração, o método não apresentou sensibilidade para a recuperação do biocomposto no solo, pois a análise sofreu interferências de outros compostos extraídos do solo. O biossurfactante não apresentou efeito antimicrobiano quando utilizado nos testes de determinação da concentração inibitória mínima e na avaliação da liberação de CO<sub>2</sub> em solo. No ensaio de influência da adição de surfactina em solo, verificou-se que além desta não apresentar ação antimicrobiana, atuou como bioestimulante no solo, aumentando a liberação de CO<sub>2</sub> de 9,78 para 216,29 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo na adição de 4000 mg/kg de surfactina após 35 dias de experimento. No ensaio de biorremediação de óleo diesel, o tratamento bioestimulado apresentou 60,48% de biodegradação ao final de 60 dias de experimento. Entretanto, os tratamentos com bioaumentação e bioestimulação não apresentaram redução significativa do contaminante quando comparados a atenuação natural. Não foi possível avaliar a biodegradação do óleo diesel e a produção *in situ* de biossurfactantes através de espectros de infravermelho. Desta forma, a estimulação *in situ* da produção de surfactina a partir das relações utilizadas na fermentação submersa, não é apropriada para uma concentração de 20% de óleo diesel em solo argiloso, visto que uma alta taxa de contaminante ficou adsorvido no solo, superestimando o efeito da biodegradação.

Palavras-chaves: óleo diesel; solo contaminado; surfactantes bacterianos; biodegradação.

## ABSTRACT

Despite the constant progress in understanding the mechanisms related to the effects of biosurfactants in bioremediation processes of oily residues, there is a gap in the literature regarding the measurement of the in situ production of these compounds. It is known the positive influence of biosurfactants, but there are also cases in which no effects or negative effects were observed. Therefore, it is necessary to expand the studies in contaminated sites with respect to the autochthonous microbial behavior when performing the bioaugmentation and biostimulation for the production of biosurfactants, as well as the measurement of this production in the soil, and its performance in the biodegradation of the contaminant. This study aimed to stimulate and measure the production of biosurfactants in situ during the bioremediation of diesel oil in clay soil through bioaugmentation and biostimulation. Initially, surfactin was produced by submerged fermentation using the bacterium *Bacillus methylotrophicus* and whey as a culture medium to standardize methodologies for measuring biosurfactants in aqueous medium. The biosurfactant produced was added to soil and performed studies to standardize the soil biocomposite extraction methodology and its measurement. In a second stage, it was studied the influence of the addition of partially purified surfactina of the fermentation media, on the growth of microorganisms in tubes and on the CO<sub>2</sub> release of the autochthonous microorganisms of the soil. In the third phase of the study, bioremediation of soil contaminated with 20% of diesel oil was carried out, using as strategies to stimulate the in situ production of biosurfactants, bioaugmentation and biostimulation. The bioremediation was performed for 60 days and the responses of the contaminant removal rate, the evaluation of the degradation and the production of in situ biosurfactants through infrared spectra were evaluated, further the measurement of the biosurfactants in situ as a function of the reduction of the surface tension. Biosurfactants were produced in the amount of interest, used for the elaboration of the standard curves by surface tension and Biureto method to evaluate the production of biosurfactants in situ. It was possible to perform the Biureto's standard curve for the determination of surfactin, however, when this was added to the soil and the extraction was performed, the method did not show sensitivity for the recovery of the biocomposite in the soil, since the analysis was interfered with by other compounds extracted from the soil. The biosurfactant did not present an antimicrobial effect when used in the tests to determine the minimum inhibitory concentration and in the evaluation of the release of CO<sub>2</sub> in soil. In the influence test of the addition of surfactin to soil, it was verified that besides this one did not present antimicrobial action, it acted as a biostimulant in the soil, increasing the CO<sub>2</sub> release from 9.78 to 216.29 mg C-CO<sub>2</sub>/kg of soil in addition of 4000 mg/kg surfactin after 35 days of experiment. In the bioremediation test of diesel oil, biostimulated treatment presented 60.48% of biodegradation at the end of 60 days of experiment. However, the treatments with bioaugmentation and biostimulation did not present a significant reduction of the contaminant when compared to natural attenuation. It was not possible to evaluate the biodegradation of diesel oil and the in situ production of biosurfactants through infrared spectra. By this mean, the in situ stimulation of the surfactin production from the relations used in the submerged fermentation is not appropriate for a concentration of 20% of diesel oil in clay soil, since a high contaminant rate was adsorbed to the soil, overestimating the effect of biodegradation.

Keywords: diesel oil; contaminated soil; bacterial surfactants; biodegradation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principal estrutura química da surfactina.....	28
Figura 2: Fluxograma geral para a metodologia da pesquisa. ....	35
Figura 3: Curva padrão da surfactina utilizando o método de Biureto.....	51
Figura 4: Relação entre concentração de surfactina bruta e tensão superficial em meio aquoso. .....	52
Figura 5: Curva padrão obtida na literatura para a tensão superficial em relação à concentração de surfactina, com grau de pureza de 98%.....	53
Figura 6: Liberação de CO <sub>2</sub> ao longo dos 35 dias de experimento com adição de surfactina no solo. ....	58
Figura 7: Adsorção do contaminante no tempo inicial e remoção deste para os tempos de 30 e 60 dias durante o ensaio de biorremediação.....	63
Figura 8: Espectros de infravermelho para o biossurfactante bruto e o óleo diesel utilizado na biorremediação. ....	65
Figura 9: Espectros de infravermelho para os tratamentos da biorremediação pelo período de 60 dias.....	67
Figura 10: Tensão superficial obtida das amostras extraídas da biorremediação pelo período de 60 dias.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento experimental dos ensaios de biorremediação.....	43
Tabela 2: Caracterização do soro de leite utilizado na fermentação submersa para produção de surfactina e nos ensaios de biorremediação.....	48
Tabela 3: Tensão superficial obtida na produção de biossurfactantes durante as três bateladas da fermentação submersa.....	49
Tabela 4: Teste de recuperação da surfactina em solo a partir de diferentes tempos de extração.....	54
Tabela 5: Concentração inibitória mínima para a surfactina pré-purificada. ....	56
Tabela 6: Contagem total de microrganismos após 35 dias de experimento.....	59
Tabela 7: Umidade obtida para os ensaios da biorremediação durante os 60 dias de experimento. ....	60
Tabela 8: Contagem de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis durante a biorremediação. ....	61
Tabela 9: Concentrações de surfactina obtidas a partir da tensão superficial para as amostras extraídas durante a biorremediação. ....	70

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	26
---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1	Áreas contaminadas por hidrocarbonetos .....	16
2.2	Biorremediação .....	17
2.2.1	Fatores ambientais .....	18
2.2.2	Bioestimulação .....	20
2.2.2.1	Fonte de carbono .....	21
2.2.2.2	Fonte de nitrogênio e fósforo .....	23
2.2.2.3	Micronutrientes .....	24
2.2.3	Bioaugmentação .....	24
2.3	Biossurfactantes e microrganismos produtores .....	25
2.4	Estrutura química da surfactina .....	28
2.5	Influência dos biossurfactantes em processos de biorremediação .....	29
2.6	Técnicas de mensuração de biossurfactantes .....	32
2.6.1	Técnicas para extração e quantificação de surfactina.....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1	Produção de surfactina através de métodos biotecnológicos.....	35
3.1.1	Caracterização do soro de leite.....	36
3.1.2	Manutenção do microrganismo .....	36
3.1.3	Preparo do meio de cultivo, inoculação e controles .....	36
3.1.4	Determinação da tensão superficial do meio.....	37
3.1.5	Precipitação dos biossurfactantes .....	37
3.1.6	Liofilização do biossurfactante.....	37
3.2	Amostra de solo .....	37
3.3	Padronização de metodologia para mensuração de biossurfactantes em solo .....	38
3.3.1	Confecção da curva padrão de surfactina e mensuração por método de Biureto.....	38
3.3.2	Avaliação da redução da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante .....	39
3.3.3	Avaliação da recuperação dos biossurfactantes em solo .....	39
3.4	Avaliação da influência da surfactina sobre o crescimento microbiano.....	40
3.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima .....	40

3.4.2	Determinação da liberação de CO <sub>2</sub> .....	40
3.4.3	Contagem total de microrganismos .....	42
3.5	Ensaio de biorremediação .....	43
3.5.1	Utilização das metodologias de Biureto, tensão superficial e atividade emulsificante para determinação de biossurfactantes em solo .....	44
3.5.1.1	Determinação da atividade emulsificante .....	44
3.5.2	Determinação do teor de umidade .....	45
3.5.3	Análise de óleos e graxas.....	46
3.5.4	Análise de FTIR .....	46
3.6	Tratamento dos dados .....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1	Produção de biossurfactantes .....	48
4.2	Padronização de metodologias para determinação de biossurfactantes em solo .....	50
4.2.1	Determinação de surfactina por espectrofotometria.....	50
4.2.2	Relação entre a concentração de surfactina e tensão superficial em meios aquosos.....	52
4.2.3	Avaliação da recuperação dos biossurfactantes em solo .....	53
4.3	Influência do biossurfactante sobre o crescimento microbiano.....	55
4.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima .....	55
4.3.2	Liberação de CO <sub>2</sub> e contagem microbiana .....	57
4.4	Ensaio de biorremediação .....	60
4.4.1	Avaliação da remoção do contaminante .....	62
4.4.2	Avaliação da produção de biossurfactantes em solos.....	69
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O risco de ocorrência de impactos ambientais relacionados à contaminação do solo é alto devido aos níveis de industrialização e densidade demográfica (MOURA; FILHO, 2015), pois além do solo ser utilizado como destino final de resíduos sólidos, sofre diversos acidentes ambientais e vazamentos com derivados de petróleo, contribuindo para a contaminação dos solos, águas superficiais e subterrâneas. Para isso, a utilização de métodos biológicos para a remediação de áreas contaminadas com compostos orgânicos tem sido reconhecida como uma estratégia de baixo custo e promissora, necessitando o desenvolvimento de processos eficientes de biorremediação para a descontaminação de solos contaminados por hidrocarbonetos (SZULC et al., 2014). Diante disso, no momento atual, a poluição ambiental por hidrocarbonetos está recebendo uma grande atenção no que diz respeito às questões ambientais e de saúde pública.

As técnicas de biorremediação envolvem a atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação. Alternativamente, compostos como os biossurfactantes (moléculas tensoativas produzidas por microrganismos em bioprocessos), podem ser utilizados como coadjuvantes do processo de biorremediação. Porém, o sucesso desta técnica está diretamente associado ao potencial catabólico dos microrganismos presentes na área poluída, e com as características e disponibilidade dos contaminantes (ANTIZAR-LADISLAO et al., 2006).

Para a biorremediação de hidrocarbonetos é necessário que os poluentes estejam biodisponíveis para os microrganismos utilizarem como fonte de carbono, visto que a maior parte dos componentes do petróleo é biodegradável, de 60 a 90%, no entanto, trata-se de um processo lento (TONINI et al., 2010). A biodisponibilidade do contaminante é limitada em ambiente terrestre devido à baixa solubilidade ou interações com a matriz do solo correspondendo à inibição da taxa de degradação (HARMS; BOSMA, 1997). Os biossurfactantes podem ser utilizados para aumentar a biodisponibilidade do contaminante, fator importante durante os processos de biodegradação de resíduos oleosos. Outra característica importante para a biodegradação é a obtenção e manutenção da alta atividade microbiana (SZULC et al., 2014), o que pode ser alcançado através da otimização de estudos e cepas adaptadas ao contaminante.

A presença de biossurfactantes nos solos impactados tem duas finalidades: a primeira servir como molécula tensoativa que favorece a disponibilidade do contaminante para a fase aquosa, aumentando a área superficial da substância hidrofóbica e permitindo a mobilização

do contaminante que está incorporado na matriz do solo, e a segunda por serem bioestimulantes, em função de serem constituídos por moléculas orgânicas que são fontes de macronutrientes para os microrganismos presentes no solo. Mas isto só ocorrerá quando os fatores ambientais *in situ* forem favoráveis à microbiota, sendo necessária uma quantidade suficiente de nutrientes indispensáveis, como nitrogênio e fósforo, para uma eficaz biorremediação.

Entretanto, sabe-se que estes biocompostos são produzidos naturalmente nos solos biorremediados pelos microrganismos, sem que haja uma mensuração da produção destes compostos nos processos *in situ* e da sua influência sobre a quantidade de microrganismos presentes, bem como sobre sua eficiência nos processos de descontaminação. Além desse fato, sabe-se que algumas moléculas de biossurfactantes apresentam toxicidade aos microrganismos, podendo atuar como antibióticos, sem que se tenham esses efeitos mensurados para os microrganismos do solo, que podem estar envolvidos nos processos de biorremediação.

Apesar dos progressos significativos sobre a explicação dos mecanismos envolvidos na produção de biossurfactantes, existem muitos fatores que não são suficientemente elucidados. Embora se comprove que a aplicação de biossurfactantes na biorremediação é altamente benéfica perante estudos iniciais em curto prazo, nenhum efeito, ou algum retardo tem sido observado, em especial para tratamentos *in situ* (LAWNICZAK et al., 2013). Estas contradições podem ser explicadas por uma grande falta de coerência entre estudos realizados em condições de laboratório e a campo. Outro desafio é a sorção do biossurfactante na matriz do solo, já que isto diminuiria a sua concentração e, conseqüentemente, reduziria a eficiência da taxa de degradação do contaminante. Desta forma, ainda não foram esclarecidas as complexas interações entre a matriz do solo, biossurfactantes, microrganismos e contaminantes, apesar da sua influência atraente para utilização no campo da biorremediação.

O Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental (PPGEng), em sua linha de pesquisa de Infraestrutura Sustentável, tem desenvolvido pesquisas a respeito do reuso de efluentes industriais em conjunto com a geotecnia ambiental. Desta forma, esta dissertação enquadra-se na temática de aplicação de biocompostos produzidos a partir de um subproduto agroindustrial para auxiliar em processos de biorremediação com óleo diesel, para minimizar os impactos negativos causados pelo homem sobre o meio ambiente, ampliando a temática das pesquisas do PPGEng.

O objetivo geral da pesquisa foi estimular e mensurar a produção de biossurfactantes *in situ* durante a biorremediação de óleo diesel em solo argiloso.

Os objetivos específicos foram:

- a) Realizar a produção de biossurfactantes via fermentação submersa;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes produzidos;
- c) Avaliar a influência dos biossurfactantes produzidos na atividade respiratória dos microrganismos em solos;
- d) Desenvolver metodologias para a mensuração da produção *in situ* de biossurfactantes em solos;
- e) Avaliar a influência da bioestimulação e bioaugmentação na biorremediação e na produção de biossurfactantes em solos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Áreas contaminadas por hidrocarbonetos

Das unidades da federação do Brasil que apresentam a quantificação de suas áreas contaminadas, destaca-se a contaminação ocasionada por postos de combustíveis. Em Minas Gerais 74% (475 locais) das áreas são contaminadas por postos de combustíveis, e das contaminações cadastradas, os hidrocarbonetos são o principal grupo de contaminantes (FEAM, 2016). No Rio de Janeiro, 59% (192 locais) é ocasionado por postos de combustíveis (INEA, 2015), e em São Paulo ocorre o maior índice com 72% (4.284 locais) contaminados por domínio de postos de combustíveis (CETESB, 2017).

O aumento do número de áreas contaminadas registradas no Brasil irá ampliar oriundo do surgimento de novas legislações. Nos registros brasileiros existentes hoje, têm-se destaque aos hidrocarbonetos como uma grande fonte de contaminação provocada principalmente pelos vazamentos em postos de combustíveis. Esta propagação ocasiona problemas ao meio ambiente, predominantemente ao solo e as águas subterrâneas, apresentando riscos à saúde pública. Assim como, a Resolução CONAMA nº 273/2000 considera que toda instalação e sistema de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais.

Dos produtos secundários do petróleo o óleo diesel é o que possui maior comercialização no Brasil, alcançando 54,3 milhões de m<sup>3</sup> de vendas, volume correspondente a 44,9% do total de derivados do petróleo para o ano de 2016 (ANP, 2017), no qual o Rio Grande do Sul foi responsável por 6,5% do total de vendas de óleo diesel.

O óleo diesel é, portanto, o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, em máquinas agrícolas, entre outros, atendendo as mais diversas necessidades. Este combustível é constituído basicamente por hidrocarbonetos saturados como a parafina, hidrocarbonetos aromáticos e alcanos normais, ramificados e cíclicos. É um produto inflamável, tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão, com odor forte e característico, apresentando 5% em volume de biodiesel (BR, 2016). A solubilidade em água do óleo diesel é baixa, apresentando alta estabilidade do anel aromático e elevado coeficiente de adsorção (ONUR, 2015). Existem diferentes formas de comercialização do óleo

diesel brasileiro para o segmento automotivo, variando basicamente o número de cetano mínimo que corresponde às características de ignição. Este combustível tem sido considerado potencialmente carcinogênico para os seres humanos devido aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) presentes durante a sua combustão (KAUPPI, 2011). Por isso, devido aos seus efeitos nocivos, o óleo diesel deve ser tratado e removido do ambiente.

## 2.2 Biorremediação

Dentre as técnicas para remediações de solos, a biorremediação é uma estratégia menos agressiva ao meio ambiente, mais adequada e eficaz para a manutenção do equilíbrio ecológico, tem sido reconhecida como de baixo custo e promissora (SZULC et al., 2014; LIN et al., 2011; GAYLARDE et al., 2005), além de apresentar preferência pela população (KUPPUSAMY et al., 2017). Pode ser definida como um processo que utiliza o metabolismo de microrganismos que possuem a capacidade de degradar o contaminante, para eliminar ou transformar em produtos menos prejudiciais, ou a sua redução a níveis de concentrações aceitáveis. Resultando em moléculas com estruturas menos recalcitrantes em relação à molécula original, ou na mineralização total do contaminante, produzindo compostos químicos simples, como nitratos, sulfatos, fosfatos, formas amoniacais, água, gás carbônico e outros compostos inorgânicos (OLIVEIRA; ALVES, 2013; TONINI et al., 2010; GAYLARDE et al., 2005). A eficiência da biorremediação é afetada pela capacidade dos microrganismos autóctones em utilizar os hidrocarbonetos disponíveis e permanecer ativo no local de tratamento (LIN et al., 2011).

As estratégias usadas para a biorremediação podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, em que não há necessidade de remoção do material, realizando-se no próprio local contaminado evitando o transporte do material, e conseqüentemente na redução do custo; e as técnicas *ex situ*, em que é necessário remover o material contaminado e encaminhar para um local adequado, evitando o alastramento da contaminação (OLIVEIRA; ALVES, 2013; TONINI et al., 2010).

Uma estratégia que pode ser realizada é a bioestimulação, que consiste na adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos que estimulam a degradação do contaminante pela microbiota nativa através da atividade metabólica (TONINI et al., 2010), tornando as características físicas do sítio contaminado mais propício a biorremediação (PEREIRA et al., 2012). A vantagem deste método consiste na estimulação dos microrganismos já adaptados as condições ambientais do local, que podem conduzir ao sucesso do tratamento. Outra

estratégia é a bioaumentação que é realizada através da inserção de microrganismos produtores de biossurfactantes nos solos, além da estratégia de atenuação natural que é uma alternativa que ocorre naturalmente no local contaminado sem nenhuma intervenção, realizando-se o monitoramento da área e do possível deslocamento da pluma de contaminante.

Para que os microrganismos realizem a biodegradação é necessário que o contaminante esteja disponível no local. Com o intuito que isto ocorra, os microrganismos produzem substâncias extracelulares, denominados biossurfactantes, que deixam o contaminante mais biodisponível para ser utilizado nas suas vias metabólicas. Porém são necessárias condições ambientais adequadas para que ocorra a biodegradação do contaminante, pois caso contrário, o microrganismo entrará em latência até que as condições ideais sejam alcançadas.

Portanto, para a aplicação da estratégia de biorremediação devem-se conhecer as condições locais do ambiente contaminado, havendo a necessidade de caracterizar o local, bem como estudos prévios em pequena escala para o conhecimento de fatores que possam vir a interferir no processo. Antes de aplicar a estratégia sugere-se conhecer os seguintes fatores, de acordo com Boopathy (2000):

- a) Se o contaminante é biodegradável;
- b) Se a biodegradação está ocorrendo naturalmente no local contaminado;
- c) Se as condições ambientais são adequadas para a biodegradação;
- d) Se o poluente não for completamente degradado, qual será o comportamento do material residual.

### **2.2.1 Fatores ambientais**

As condições ambientais como temperatura, disponibilidade de oxigênio, pH, umidade devem ser controlados e ajustados no decorrer do bioprocessamento, pois influenciam na utilização dos poluentes pelos microrganismos (PEREIRA et al., 2012; TONINI et al., 2010; DESAI; BANAT, 1997). O controle e a otimização das condições ambientais são fundamentais para o sucesso da ampliação de escala da produção dos biossurfactantes, capazes de torná-los economicamente competitivos em relação aos surfactantes químicos (FONTES et al., 2008).

A temperatura influencia no consumo do substrato pelos microrganismos, através da sua atividade metabólica e a biodegradação (HAIDER, 1999). A maioria das fermentações realizadas em laboratório, para a produção de biossurfactantes, ocorre em uma faixa de temperatura de 25 °C a 35 °C (FONTES et al., 2008; HAIDER, 1999). Baixas temperaturas

limitam a degradação dos poluentes, pois o metabolismo microbiano diminui, a viscosidade dos hidrocarbonetos aumenta nestas condições e a volatilização dos alcanos de cadeia curta é reduzida, levando a um processo de biodegradação mais lento, entretanto, em altas temperaturas, a toxicidade destes compostos aumenta, sendo recomendada então a faixa de temperatura entre 30 °C a 40 °C para ocorrer a diminuição da viscosidade dos compostos e aumento do metabolismo microbiano (PEREIRA et al., 2012; LEAHY; COLWELL, 1990).

A degradação microbiana de hidrocarbonetos é muito mais rápida em condições aeróbicas do que em condições anaeróbicas (DÍAZ, 2004). Em solos superficiais ocorre a predominância de microrganismos aeróbicos, no entanto, deve ser investigado se estes microrganismos irão apresentar a capacidade de degradar o contaminante no solo.

O pH afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons  $H^+$  na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos (JACQUES et al., 2007). O pH entre 6,9 e 8,0 em solos contaminados com hidrocarbonetos, foi favorecido para a biorremediação, havendo interações entre as bactérias e os fungos, aumentando, conseqüentemente, a remoção do contaminante (ÁNGELES; REFUGIO, 2013), ocorrendo a melhor taxa de desenvolvimento dos microrganismos em pH próximo ao neutro (PEREIRA et al., 2012).

Haider (1999) considera a umidade o fator ambiental mais crítico da biodegradação, pois a elevada atividade microbiana só ocorre com disponibilidade de água adequada. Porém, o teor de água no substrato tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, ou seja, um alto teor de água resulta em baixa concentração de  $O_2$ , causando prejuízos diretos à atividade dos microrganismos aeróbicos, que são os principais agentes de degradação dos compostos de hidrocarbonetos (TONINI et al., 2010; JACQUES et al., 2007; LEAHY; COLWELL, 1990). Ángeles e Refugio (2013) observaram que na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos durante 10 dias, a umidade permaneceu constante durante o período experimental, e que esta condição está associada diretamente com a atividade microbiana no solo.

Portanto, aperfeiçoar condições nutricionais e ambientais dos bioprocessos é essencial para a qualidade e quantidade do biossurfactante, através da otimização das propriedades físico-químicas dos biocompostos, promovendo um melhor rendimento da produção e redução dos custos. É comprovado que as fontes de carbono e nitrogênio influenciam na produção de biossurfactantes, uma vez que o tipo e a concentração do substrato empregado podem aumentar ou reduzir a síntese do biossurfactante e, até mesmo modificá-lo

estruturalmente (FONTES et al., 2008; ROBERT et al., 1989). Foi evidenciado por Jeong et al. (2015) que a bioestimulação é suficiente para a descontaminação de solos com óleo diesel, quando comparada à bioaumentação. Em geral, é preferível aumentar a atividade metabólica dos microrganismos autóctones ao invés de utilizar microrganismos exógenos, já que os microrganismos nativos estariam mais adaptados ao meio, e em princípio, mais efetivos que os demais (PEREIRA et al., 2012).

### **2.2.2 Bioestimulação**

Os microrganismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos (GAYLARDE et al., 2005). Porém, com as crescentes atividades industriais e os danos causados ao meio ambiente, ocasionaram o desequilíbrio do meio, necessitando estimular o metabolismo dos microrganismos autóctones, ou seja, do próprio solo, para degradar o contaminante que resultará em produtos simples como:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ .

Uma das vantagens da biorremediação é pela capacidade do metabolismo da comunidade microbiana atuando em conjunto, em que os produtos do metabolismo de um microrganismo podem ser substratos para outros, pois o metabolismo destes tem preferência por compostos mais simples (GAYLARDE et al., 2005), e a biodegradação é mais provável quando a estrutura química do contaminante é semelhante as estruturas de moléculas naturais, facilitando a identificação pelo sítio ativo da enzima do microrganismo.

O primeiro passo da degradação microbiana consiste em obter o melhor contato da superfície celular com o óleo e então, o transporte através da membrana celular (TONINI et al., 2010). A presença de biossurfactantes no meio aumenta a área superficial do contaminante, facilitando o acesso aos microrganismos. Os biossurfactantes são produzidos quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento microbiano, preferencialmente, porém algumas espécies podem apresentar pequena produção durante a fase exponencial (FONTES et al., 2008).

Outro fator associado à biodegradação é a disponibilidade do contaminante. Muitos contaminantes têm caráter apolar, o que na maioria das vezes não é compatível com os sítios de entrada e transportadores da membrana celular, tornando-se indisponível para o metabolismo intracelular. Alguns microrganismos contornam este obstáculo produzindo biossurfactantes e possibilitando a entrada de moléculas apolares para o interior da célula (GAYLARDE et al., 2005), justificando, desta forma, a bioestimulação em solos, para a

produção de biossurfactante, podendo aumentar a eficiência da biodegradação pelos microrganismos autóctones. Entretanto, a bioestimulação só é eficaz quando há populações microbianas degradadoras do contaminante.

Para conseguir a melhor estratégia da produção de biossurfactantes, é necessária a otimização de todos os parâmetros envolvidos no processo, desde a seleção de linhagens microbianas potencialmente produtoras dos compostos tensoativos, a biomassa microbiana, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do contaminante e a sua concentração (TONINI et al., 2010; VALPUESTA, 2008). Considera-se como fatores limitantes para a produção de biossurfactantes: o gênero do microrganismo, a fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, as possíveis limitações de macro e micronutrientes (ferro, manganês, magnésio) e os parâmetros físico-químicos do processo (aeração, temperatura, umidade e pH) (VARJANI; UPASANI, 2017; FONTES et al., 2008; VALPUESTA, 2008; KARANTH et al., 1999). Estes fatores influenciam na composição e nas características dos biossurfactantes produzidos, e quando não houver quantidades suficientes de macro e micronutrientes no solo, é necessária a adição controlada para favorecer o metabolismo celular.

Entretanto, as bactérias apresentam algumas características que propiciam sua adaptação a várias condições ambientais, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e rápida adaptação as variações do meio (TONINI et al., 2010), favorecendo a biorremediação em condições extremas.

### **2.2.2.1 Fonte de carbono**

Para que os microrganismos utilizem compostos de origem petroquímica como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, é necessário que possuam as várias enzimas que transformam as complexas moléculas em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (JACQUES et al., 2007). As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactantes são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada, assim como o comprimento da cadeia do n-alcano, que altera a biossíntese do surfactante (FONTES et al., 2008).

As fontes de carbono utilizadas na produção de biossurfactante têm influência no tipo e na quantidade que será excretada pelo microrganismo, visto que propicia alterações na estrutura da molécula, conduzindo a variações nas suas propriedades físico-químicas, e consequentemente nas suas propriedades emulsificantes (FONTES et al., 2008;

VALPUESTA, 2008). A escolha da fonte de carbono a ser utilizada deve levar em consideração não somente os custos, mas também a aplicação deste biossurfactante que será produzido.

Os microrganismos utilizam inicialmente os substratos hidrofílicos para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, em quanto os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante (FONTES et al., 2008). Outro fenômeno importante é a síntese de biossurfactante a partir de glicose e outros metabólicos primários, pois é relatado por Karanth et al. (1999) que nenhum agente tensoativo microbiano pode ser isolado a partir de um meio onde a glicose foi utilizada como fonte de carbono em vez de hexadecano, ou a produção de biossurfactante poderá ser reduzida, portanto, não é recomendado o uso de fontes de carbono solúveis em água para a produção de biossurfactantes.

Em solos contaminados por hidrocarbonetos, o principal obstáculo para a biorremediação é o teor de carbono em excesso que afeta a relação C:N:P (ÁNGELES; REFUGIO, 2013). Além disso, a população microbiana pode reduzir após o esgotamento de hidrocarbonetos facilmente degradáveis (baixo peso molecular) no solo, pois após a fase inicial do tratamento restam os compostos mais recalcitrantes a biodegradação (LIN et al., 2011), dificultando a permeabilidade através da membrana exterior dos microrganismos.

É relatado que os microrganismos produzem compostos tensoativos, preferencialmente, quando cultivados na presença de hidrocarbonetos, porém em alguns casos os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de substratos simples, como os carboidratos, apresentando algumas vantagens como: uso de matérias primas renováveis e possibilidade de modificação da estrutura do composto tensoativo, que influenciará nas propriedades e no desenvolvimento de produtos para aplicações específicas (VALPUESTA, 2008).

Outra possível alternativa é o uso de fontes de carbono de origens renováveis como, por exemplo, subprodutos da agroindústria. Essa estratégia diminui a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente e, conseqüentemente, os custos da produção do biossurfactante (FONTES et al., 2008). Além disso, em solos, a matéria orgânica também é fonte de carbono e de energia para os microrganismos, portanto, um alto teor de matéria orgânica está associado a uma maior abundância e diversidade microbiana. Porém, uma grande quantidade de matéria orgânica, está normalmente relacionada a substratos de partículas finas, que propiciam a sorção dos hidrocarbonetos (TONINI et al., 2010), pois a matéria orgânica é a principal matriz hidrofóbica do solo (JACQUES et al., 2007).

### 2.2.2.2 Fonte de nitrogênio e fósforo

As transformações que concedem energia para o crescimento dos microrganismos, requer a presença de doadores e aceptores de elétrons. Por isso, além da fonte de carbono é necessário adição de nutrientes para que ocorra a biodegradação a partir do metabolismo microbiano.

As fontes de nutrientes e a presença de seus elementos traços devem receber atenção, pois influenciam no custo e na qualidade dos biossurfactantes produzidos, além de que a adição de nitrogênio pode tanto estimular quanto inibir a produção de biocompostos (VALPUESTA, 2008). No meio, o nitrogênio é essencial para o crescimento celular e para a síntese de proteínas e enzimas (FONTES et al., 2008).

Há diferentes fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas, como: nitrato de amônio, ureia, triptona, extrato de levedura, cloreto de amônio, sulfato de amônio (DECESARO, 2016; ÁNGELES; REFUGIO, 2013; SOUSA, 2012). O extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada para a produção de biossurfactantes, mas a sua concentração varia de acordo com o microrganismo e o meio de produção (FONTES et al., 2008). É verificado na literatura, que a maioria dos pesquisadores optam por utilizar mais de um tipo de fonte de nitrogênio, obtendo boas concentrações de biossurfactantes. Sousa (2012) avaliou o sulfato de amônio, nitrato de amônio e nitrato de sódio para produção de biossurfactantes (surfactina), e verificou que a maior produção e a maior redução da tensão superficial foram obtidas quando utilizado sulfato de amônio ou nitrato de amônio. O sulfato de amônio também tem a vantagem de vir acompanhado de uma molécula de enxofre, que consiste em um macronutriente essencial para o desenvolvimento dos microrganismos.

Já para o fósforo, Ángeles e Refugio (2013) constataram que elementos traços para este nutriente foram os mais consumidos pelos microrganismos, demonstrando uma preferência microbiana por fósforo sobre outros nutrientes. Para Lin et al. (2011) em um dos seus tratamentos da biorremediação, notou que a adição de nutrientes no solo aumentou a capacidade das bactérias endógenas na biodegradação de óleo diesel. A concentração de fósforo no solo aumentou cerca de três vezes após o tratamento com adição de nutrientes. Embora, o nitrogênio tenha sido sugerido como o nutriente inorgânico limitante primário em biorremediação a eficiência da degradação do óleo diesel foi maior com o aumento da concentração de fósforo no solo, utilizando 30 mM de fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e 30 mM de fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Mnif et al. (2015) utilizaram 1 g/L de fosfato dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e 0,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para avaliar a degradação de óleo diesel, e Karanth et al.

(1999) observaram que o crescimento da população bacteriana autóctone foi melhorada para a degradação de compostos petrolíferos utilizando  $K_2HPO_4$ .

### **2.2.2.3 Micronutrientes**

Há poucas comprovações que sais minerais podem influenciar qualitativamente e quantitativamente na produção de biossurfactantes. Porém os íons como  $Mg^{+2}$ ,  $Fe^{+2, +3}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+1, +2}$ ,  $Co^{+2, +3}$ ,  $Na^{+1}$ ,  $K^{+1}$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ , podem influenciar positivamente na produção de biossurfactantes, quando inseridos como solução de minerais contendo os elementos traços. Geralmente, são elementos que compõem a estrutura das enzimas (COLLA et al., 2012). Mesmo que a disponibilidade da fonte de carbono seja alta, o crescimento microbiano ainda será inibido quando a concentração de micronutriente for limitada (LAWNICZAK et al., 2013).

### **2.2.3 Bioaugmentação**

O processo de bioaugmentação visa melhorar a degradação dos contaminantes presentes no solo através da inserção de consórcios microbianos produtores de biossurfactantes (MNIF et al., 2017). A bioaugmentação pode ocorrer através do isolamento e seleção de microrganismos de áreas contaminadas, utilizando cepas com capacidade previamente comprovada de degradar o composto tóxico ou por microrganismos geneticamente modificados (SARKAR et al., 2005).

Como a biodegradação é um processo onde a competição por fontes de carbono muitas vezes resulta em interações antagônicas entre microrganismos, as chances de se introduzir com sucesso certos consórcios microbianos no ambiente poluído podem ser aumentados pela seleção consciente (MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2010; LAWNICZAK et al., 2013). Além disso, é importante compreender os papéis individuais de cada microrganismo para determinar quais componentes estão sendo degradados (BACOSA et al., 2013).

Preferencialmente, deve-se realizar uma seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes isolados da microflora nativa. Alternativamente, pode-se realizar a aplicação de consórcios microbianos com potencial de produção, os quais tenham alta similaridade entre os membros do consórcio e microrganismos autóctones. Além disso, há a possibilidade de uso de microrganismos isolados não produtores que podem ser geneticamente modificados para

excretar biossurfactantes, no qual esse procedimento é desenvolvido pela engenharia genética, que visa introduzir genes produtores de biossurfactantes e posterior reintrodução na área poluída, no entanto, o número de estudos que verifica a viabilidade desta estratégia é muito limitada. No geral, uma vez que os protocolos de bioaumento atuais devem aderir as normas rígidas e não asseguram que a eficiência desejada do tratamento seja alcançada, esta estratégia que é potencialmente promissora está sendo raramente empregada (LAWNICZAK et al., 2013).

Mnif et al. (2017) apresentam uma potencial aplicabilidade da técnica de bioaumento, no qual realizaram um estudo com quatro bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, em conjunto com um biossurfactante do tipo lipopeptídico para aumentar a biodegradação do óleo diesel. Na presença de 0,1% de biossurfactantes resultou em um aumento de 12,19% na biodegradação. A maior taxa de degradação, cerca de 32,67%, foi registrada quando o consórcio das linhagens de *Bacillus subtilis* SPB1 e *Acinetobacter radioresistens* RI7 foi utilizado. Os resultados indicam a potencial aplicabilidade do consórcio selecionado, juntamente com os biossurfactantes *ex situ* e *in situ*, para a biorremediação de solo contaminando com óleo diesel.

### 2.3 Biossurfactantes e microrganismos produtores

É necessário que os biossurfactantes possuam as propriedades de superfícies ativas como a redução da tensão superficial, formação de emulsão e capacidade de estabilização, para estar associado à produção destes biocompostos e a sua aplicabilidade industrial. Os biossurfactantes podem ser utilizados em indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica, em produtos químicos agroindustriais, produtos de limpeza, e participando nas descontaminações de áreas degradadas através da sua produção *in situ* e/ou *ex situ*.

Existem diversos tipos de microrganismos capazes de produzir biossurfactantes com diferentes propriedades, como apresentado no Quadro 1 para os diferentes tipos de biocompostos e seus respectivos microrganismos produtores.

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana, sendo as mais reportadas dos gêneros, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., e *Acinetobacter* sp. (MULLIGAN, 2009), pois as bactérias são os agentes mais ativos na degradação de compostos petrolíferos (PEREIRA et al., 2012), podendo ser isoladas do solo, água do mar, áreas contaminadas por hidrocarbonetos, em que as condições selecionam

microrganismos com habilidade de utilizar fontes hidrofóbicas de carbono (PINTO et al., 2009).

Quadro 1: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

<b>Tipo de biossurfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Glicolipídios</b>	
Raminolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, Torulopsi sapicola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídios e lipoproteínas</b>	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
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>
<b>Surfactantes particulados</b>	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: MULLIGAN; GIBBS, 1993 apud MULLIGAN, 2005; KARANTH et al., 1999; DESAI; BANAT, 1997 (adaptado).

O crescimento na utilização de biossurfactante pode ser atribuído a uma evolução na abordagem da produção industrial, o que favorece tanto a consciência ambiental quanto a sustentabilidade através do uso de recursos renováveis (LAWNICZAK et al., 2013). O uso de microrganismos que possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos e produzem biossurfactantes, podem ser utilizados de forma eficaz na biorremediação de locais contaminados com compostos oleosos. Portanto, estes biocompostos apresentam três funções principais: aumentar a área superficial dos substratos hidrofóbicos insolúveis em água, aumentar a biodisponibilidade dos substratos hidrofóbicos pelo aumento de sua solubilidade aparente e influenciar a adesão de microrganismos a superfície (BARROS et al., 2007).

Lin et al. (2011) estudaram diferentes tratamentos para a biorremediação de solo em biopilhas, com 22% de areia e 28% de argila, contaminado com óleo diesel durante 100 dias. Nas biopilhas em que foi adicionado 1 g/L de biossurfactante do tipo raminolipídios produzido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* J4, alcançou uma eficiência de degradação de 86% após os 100 dias de tratamento. Observaram que a adição do biossurfactante aumentou a solubilidade dos hidrocarbonetos, que permitiu as bactérias degradadoras de óleo diesel se aderir à interface hidrocarboneto/água.

Ma et al. (2016) estudaram *Pseudomonas aeruginosa* DN1 isolada de amostra de solo contaminado com petróleo. O biossurfactante (raminolipídio) produzido pela bactéria reduziu a tensão superficial da água de 45,23 a 25,88 mN/m, e apresentou uma excelente emulsificação (100%). Além disso, o microrganismo foi capaz de degradar o petróleo bruto (90,52%) através do uso dos biossurfactantes.

Neves et al. (2011) avaliaram a produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus atrophaeus* ATCC9372 em meio com soro de leite. Este subproduto mostrou-se um meio apropriado para ser utilizado no cultivo, pois obteve boa produtividade de biossurfactantes quando comparado ao cultivo que foi utilizado glicose.

Decesaro (2016) avaliou a aplicação dos biossurfactantes produzidos em escala laboratorial, em meios de cultivo composto por soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite suplementados por fonte de nitrogênio, micronutrientes e indutores. Posteriormente, o biossurfactante (surfactina) foi aplicado na biorremediação de solo contaminado com 20% de biodiesel durante 90 dias, e obteve remoção máxima (57,25%) nos ensaios realizados com adição de 0,5% de biossurfactante. O autor verificou que o uso de biossurfactantes auxiliou na remoção do biodiesel em solo. Portanto, consegue-se verificar a contribuição dos biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp.

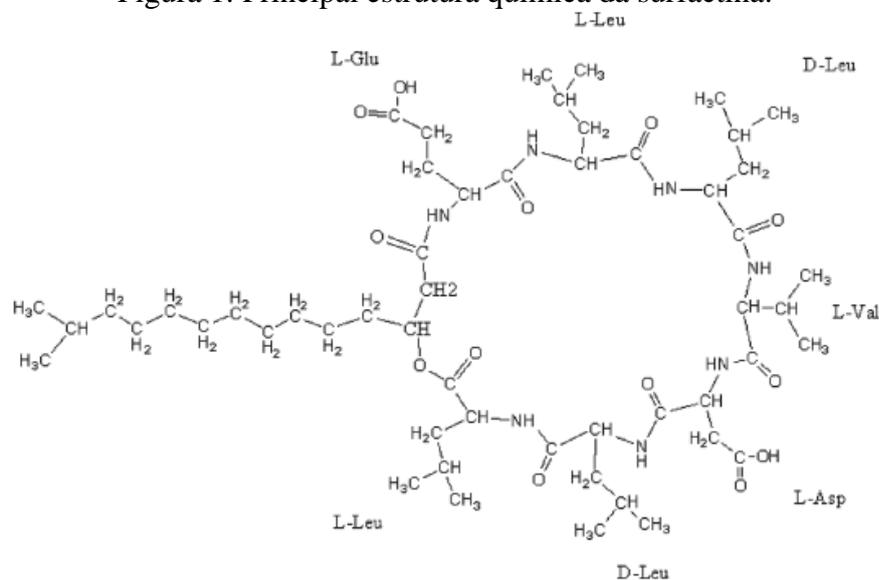
## 2.4 Estrutura química da surfactina

Com o intuito de mensurar biossurfactantes do tipo surfactina em solo, faz-se necessário conhecer as suas propriedades químicas para a adequada determinação de cada metodologia a ser utilizada.

A surfactina é um lipopeptídeo, como apresentada na Figura 1, chamada de pumilacidina (PEYPOUX et al., 1999), sendo confirmado por Desai e Banat (1997) a produção de surfactina por *B. subtilis* e *B. pumilus*.

Os surfactantes lipoprotéicos são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas e alto poder de redução da tensão superficial. Esse tipo de biocomposto, geralmente, se caracteriza pela existência de peptídios ligados a ácidos graxos, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, onde a porção protéica da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos estão frequentemente dispostos em uma estrutura cíclica (BINIARZ et al., 2017; SIGMA-ALDRICH, 2017; VARJANI; UPASANI, 2017; CHEN et al., 2015; MAIER, 2003 apud BARROS et al., 2007; FERNANDES, 2006).

Figura 1: Principal estrutura química da surfactina.



Fonte: BARROS et al., 2007.

A surfactina natural pode apresentar variações, que dependem da linhagem do microrganismo e das condições ambientais e nutricionais, apesar da surfactina ter demonstrado estabilidade em variações de temperatura, pH e concentrações salinas (BARROS et al., 2007), e o álcool etílico se apresenta como o solvente da surfactina (SIGMA-ALDRICH, 2017).

Para a característica molecular da surfactina, Soares (2014) encontrou pesos moleculares em torno de 1000 Da para a surfactina padrão utilizando a técnica de espectrometria de massa, e Araújo et al. (2013) encontraram massa molecular de 1036 g/mol para o lipopeptídeo com sete aminoácidos e quinze carbonos na porção lipídica, produzido por *Bacillus subtilis*. Estudos toxicológicos para a surfactina apontam baixa toxicidade *in vivo* em ratos (BARROS et al., 2007), e eficaz na inibição de microrganismos gram-positivos (ARAUJO et al., 2016).

## **2.5 Influência dos biossurfactantes em processos de biorremediação**

Um fator limitante para a degradação do contaminante é a natureza física da matriz do solo, pois solos e sedimentos têm a propriedade de, através da atração de cargas opostas, adsorver moléculas, diminuindo, desta maneira, a biodisponibilidade do poluente (GAYLARDE et al., 2005). Como a composição da fase sólida do solo determina a sua capacidade de sorção dos hidrocarbonetos, é de se esperar que solos com diferentes conteúdos de matéria orgânica e composições mineralógicas apresentem diferentes capacidades de sorção e de biodisponibilidade do poluente aos microrganismos degradadores do solo (JACQUES et al., 2007). Os hidrocarbonetos sofrem adsorção nas partículas do material em suspensão, o que provoca forte tendência a acumularem-se nos sedimentos (PEREIRA et al., 2012), e a degradação pode ser limitada pela dessorção e pela transferência de massa do hidrocarboneto na matriz do solo (LIN et al., 2011).

Para aumentar a disponibilidade do contaminante aos microrganismos degradadores, eles contornam este obstáculo produzindo biossurfactantes, uma vez que estes compostos atuam como agentes emulsionantes e surfactantes, diminuindo a tensão superficial dos compostos orgânicos e ajudam na formação de micelas. Estas micelas são como microgotículas que podem ser encapsuladas na superfície de células microbianas hidrofóbicas e são levadas para dentro dos microrganismos e são degradadas.

Quando as concentrações dos contaminantes são baixas, os microrganismos podem não produzir as enzimas necessárias para a degradação, e quando são muito altas, os mesmos podem ser inibidos (GAYLARDE et al., 2005), podendo não ocorrer a produção de biotensoativos.

Embora muitos estudos têm utilizado os biossurfactantes para aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, o seu efeito pode ser controverso. O uso de biossurfactante melhora a solubilidade dos contaminantes e o acesso para os microrganismos

degradantes (PANTSURNAYA et al., 2011). No entanto, alguns pesquisadores verificaram que ocorre a adsorção significativa do biocomposto no solo (JEONG et al., 2015), além da biodegradação competitiva como fonte de carbono, e toxicidade no meio (LAWNICZAK et al., 2013), gerando efeitos inibidores sobre a biodegradação (ONUR, 2015).

Ángeles e Refugio (2013) estudaram a produção de biossurfactantes *in situ* em tratamentos com bioaumentação e bioestimulação para remoção de hidrocarbonetos, em solos irradiados e não irradiados. Os resultados foram comparados com um tratamento controle que consistiu na adição de apenas água esterilizada ao solo. Em solos não irradiados, no tratamento com microrganismos nativos suplementado com *Pseudomonas putida*, a remoção de hidrocarbonetos de petróleo (TPH) foi de 40,60%, a produção de raminolipídio foi de 1,54 mg/kg, e a tensão superficial foi de 64 mN/m. Nos tratamentos com adição de *P. putida* e nutrientes, os níveis de TPH foram reduzidos em 33,70%, e a produção de biotensoativo e a tensão superficial foi de 2,03 mg/kg e 67,30 mN/m, respectivamente. Em solo irradiado no tratado com *P. putida*, a remoção de TPH foi de 24,50% com a geração de raminolipídio de 1,79 mg/kg e 65,60 mN/m de tensão superficial. Quando os nutrientes e *P. putida* foram adicionados, a remoção TPH foi de 61,10%, 1,85 mg/kg de biossurfactantes foram produzidos, e a tensão superficial de 55,60 mN/m. A produção de raminolipídio por *P. putida* ajudou na descontaminação dos solos contaminados com hidrocarbonetos, demonstrando que esta é uma abordagem atraente para biorremediação em maior escala. Concluiu-se que, quando ocorre aumento na quantidade de raminolipídios, conseqüentemente há maior remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo.

Ángeles e Refugio (2013) observaram também que a dessorção do contaminante durante os experimentos poderia ser atribuído aos biossurfactantes, incluindo os raminolipídios produzidos pelos microrganismos, ou à ruptura de restos celulares no solo.

Szulc et al. (2014) estudaram a adição de raminolipídios para a biodegradação do óleo diesel em estudos de campo e laboratório, avaliando a influência da bioaumentação. Os experimentos laboratoriais analisados a partir da medição de CO<sub>2</sub> e atividade de desidrogenase foram utilizados para selecionar um consórcio microbiano, que consistiu de oito bactérias para a bioaumentação, e avaliaram a concentração mais adequada de raminolipídios, em que se estabeleceu a aplicação de 150 mg/kg de raminolipídios por 1 kg de solo, era a mais apropriada em termos de atividade desidrogenase. Posteriormente, foi realizado o estudo de campo durante 365 dias em solo de grão fino argiloso, analisando-se: I) atenuação natural; II) adição de raminolipídios; III) bioaumentação; IV) bioaumentação e adição de raminolipídios, concluindo-se que a bioaumentação contribui para aumentar a

eficiência de biodegradação do óleo diesel, e a adição de raminolipídios não influenciou nos processos de biorremediação pois foi um estímulo a curto prazo. Considerou-se que a idade da contaminação também pode ser avaliada como um fator importante, que é capaz de vir a influenciar a eficiência dos processos, assim como as diferentes concentrações de matéria orgânica no solo.

Mnif et al. (2015) estudaram a capacidade de degradação do óleo diesel no solo, por um consórcio microbiano composto por bactérias do gênero *Bacillus* e *Acinetobacter*. O melhor resultado foi com a co-inoculação das bactérias produtoras de biossurfactantes *B. subtilis* e *A. radioresistens*, o qual aumentou a degradação em mais de 50%. A adição direta do biossurfactante (0,1%) também melhorou o rendimento da biodegradação em 38,42%. Os resultados demonstraram que as bactérias com potencial catabólico para degradar contaminantes hidrofóbicos podem interagir sinergicamente com estirpes produtoras de surfactantes para acelerar a biodegradação do óleo diesel. Na verdade, o biotensoativo produzido *in situ* pode contribuir significativamente para a solubilização e emulsificação do óleo diesel aumentando assim a sua biodisponibilidade. Além disso, a adição do biossurfactante acelerou a primeira fase de crescimento que pode ser devido à assimilação do composto como uma fonte de carbono mais acessível, iniciando o estímulo do crescimento microbiano para posterior assimilação do substrato imiscível.

Como o biossurfactante se deposita na interface óleo/água, a sua presença irá limitar o contato entre os microrganismos e os substratos e, assim, inibir a taxa de biodegradação (LAWNICZAK et al., 2013). Neste contexto a camada do biossurfactante seria um obstáculo para a captação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos, devendo ser removidos a fim de prosseguir com o processo de biodegradação.

A biodegradabilidade dos biossurfactantes é um fator positivo, pois eles não persistem no ambiente após o tratamento, mas por outro lado como o biossurfactante será lentamente removido o seu efeito diminuirá (LAWNICZAK et al., 2013). Também é possível que o biossurfactante possa ser biodegradado antes que sua ação esperada ocorra, podendo ser através da interferência do biossurfactante na absorção direta do hidrocarboneto ou devido ao fato que essas moléculas podem ser tratadas como uma fonte preferencial de carbono em relação ao alvo que seria o contaminante. Ainda de acordo com Lawniczak et al. (2013), uma possível solução para este problema seria a aplicação de microrganismos que não degradam preferencialmente biossurfactantes. Outra hipótese é de que o crescimento bacteriano e, posteriormente, a degradação dos hidrocarbonetos, ocorrem na adição do biossurfactante devido ao fato deste ser biodegradável e podendo ser utilizado como fonte primária de

carbono, sendo mais fácil iniciar o crescimento dos microrganismos em substratos não solúveis em água (BAUTISTA et al., 2009).

Outra forma relevante de interações entre biossurfactantes e contaminantes tóxicos foi relatado por Chrzanowski et al. (2011), em que um efluente contaminado por hidrocarbonetos com presença de clorofenóis teve sua toxicidade reduzida na presença de raminolipídios, devido ao aprisionamento dos clorofenóis nas micelas do biossurfactante e as interações hidrofóbicas entre estes dois grupos de compostos.

Apesar da influência, positiva em termos da disponibilidade do contaminante e na eficiência de descontaminação, é relatado também casos em que não se observou nenhum efeito ou até mesmo a inibição da taxa de remoção. A principal razão é, talvez, a inconsistência entre a função pretendida do biossurfactante em processos de tratamento de contaminantes e o seu real papel na microbiota dos microrganismos que ultrapassa os limites da biorremediação (LAWNICZAK et al., 2013), sendo necessário elucidar as interações de biossurfactantes, microrganismos e o contaminante.

## 2.6 Técnicas de mensuração de biossurfactantes

Em técnicas de biorremediação sabe-se que ocorre a produção de diversas classes de biossurfactantes por diferentes microrganismos. No entanto, ocorrem dificuldades e ausência de metodologias para a mensuração do biotensoativo no solo, possibilitando o desenvolvimento de diferentes técnicas para esta finalidade.

Os biossurfactantes bacterianos são os mais relatados na literatura, principalmente dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. e *Arthrobacter* sp. (FONTES et al., 2008; JACQUES et al., 2007). Os dois primeiros gêneros de microrganismos são facilmente encontrados em solos, e comprovadamente degradadores de compostos do petróleo (MNIF et al., 2017; MA et al., 2016; MNIF et al., 2015; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2014; ALI et al., 2012; LIN et al., 2011; TONINI et al., 2010; KARANTH et al., 1999), portanto, a mensuração de surfactina é de suma importância em solos contaminados. Visto que os hidrocarbonetos são constituídos de vários tipos de moléculas, e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos presentes no ambiente contaminado, tanto em ambientes naturais quanto em laboratório (TONINI et al., 2010), ocorrendo a interação de diferentes microrganismos para a biodegradação do contaminante.

Normalmente os microrganismos degradadores de poluentes encontram-se em populações maiores e mais ativas nos locais que se apresentam contaminados, pois os

poluentes conferem auxílio na seleção de linhagens pré-dispostas a esta adaptação e degradação. Oliveira e Alves (2013) verificaram que *Pseudomonas* sp. são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), e *Bacillus* sp. capaz de degradar n-hexadecano. Sorkhoh et al. (1995) isolaram algumas bactérias do solo contaminado com óleo da guerra do Golfo apresentando dentre elas a *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. como eficientes na utilização de n-alcanos como fonte de carbono de C 14 a C 20, sendo do gênero *Bacillus* a segunda mais predominante. Justificando, a necessidade de se avaliar biossurfactantes do tipo surfactina produzidos por cepas de *Bacillus* em solos.

Contudo é necessário o desenvolvimento de diferentes técnicas de extração e purificação destes biossurfactantes no meio, como por exemplo: precipitação por solventes, ácidos ou bases, adsorção-dessorção, extração por solventes, cristalização, centrifugação, cromatografia, filtração e precipitação, ultrafiltração, fracionamento da espuma, liofilização (SATPUTE et al., 2010).

O desafio consiste em extrair o biossurfactante que se encontra junto ao solo, através de técnicas economicamente viáveis e de fácil execução, pois esta deve ser sensível o suficiente para medir o biossurfactante em meio aquoso. Após a extração do biossurfactante, podem ser utilizados outros métodos como os aplicados em bioprocessos, pois a surfactina é um lipopeptídeo que pode ser determinada através da sua porção proteica (aminoácidos).

### **2.6.1 Técnicas para extração e quantificação de surfactina**

De acordo com Junior (2012), a precipitação ácida e extração por solvente é a técnica mais viável para estudos da surfactina, por apresentar baixo custo e fácil execução, já para a determinação de biossurfactante são utilizadas as técnicas de cromatografia líquida ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (WEI; CHU, 1998).

Junior (2012) estudou diferentes meios para o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, e realizou a extração e determinação do biossurfactante. A amostra coletada foi centrifugada a 5000 rpm durante 20 min, e o sobrenadante utilizado para a determinação da concentração da surfactina o qual foi submetido à precipitação com ácido clorídrico a 6 mol/L, reduzindo até pH 2. Este acidificado foi mantido refrigerado a 4 °C por 12 horas ou até a observação da ausência de turbidez, posteriormente foi centrifugado a 10000 rpm durante 20 min para a formação de uma camada densa que seria o biossurfactante bruto. Este foi dissolvido em água com pH 7,5 e liofilizado, para posteriormente solubilização em metanol absoluto e filtrado em

membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (DAS et al., 2008). A quantificação foi realizada por HPLC (*high performance liquid chromatography*) com partículas de 5  $\mu\text{m}$ , com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  de amostra com eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, onde a detecção foi realizada a 212 nm em detector UV-Vis (MONTASTRUC et al., 2007; WEI; CHU, 1998), expresso em mg/L.

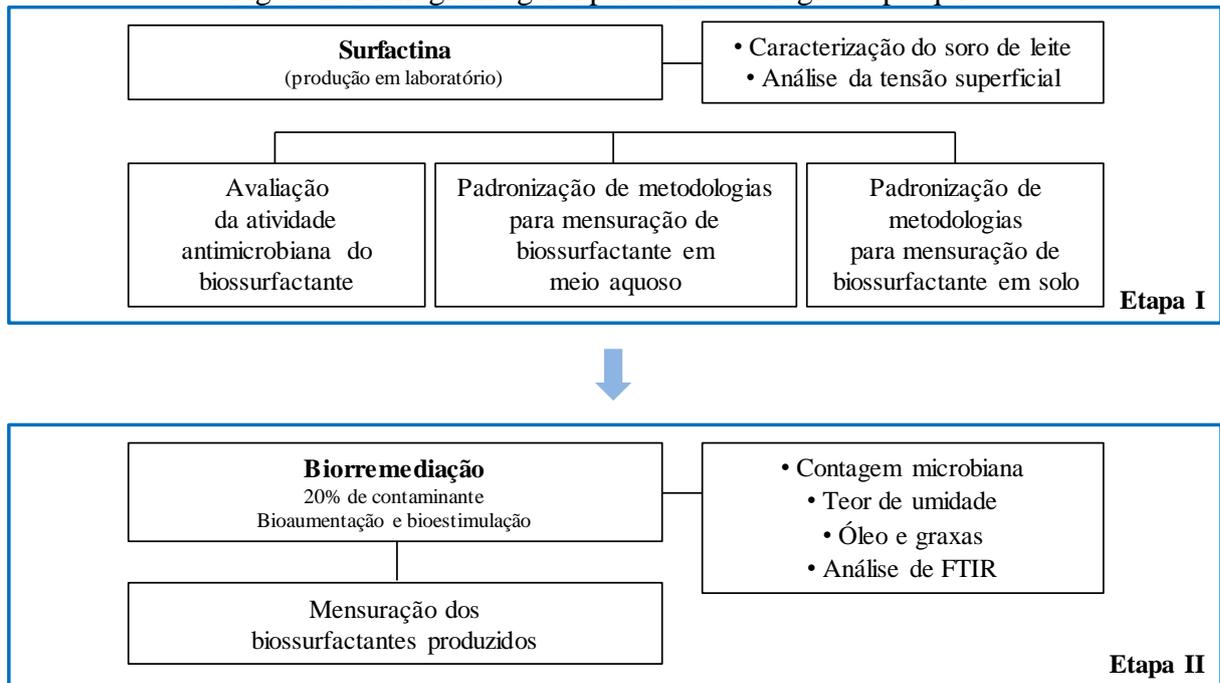
Soares (2014) estudou os biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus* sp. através da fermentação submersa em diferentes meios de cultivos (sintéticos ou naturais) e na biorremediação de óleo lubrificante. Para a extração da surfactina, uma amostra foi coletada e verificado o pH, caso necessário foi ajustado o pH para 7 quando o mesmo  $\leq 5$ , pois o biossurfactante precipita em pH ácido, podendo ocorrer perdas do bioproduto juntamente com as células na etapa posterior. A amostra foi centrifugada a 10000 rpm durante 20 min para separação da biomassa. Uma amostra de 20 mL de sobrenadante livre de células ajustou-se o pH para 2 com HCl 3N, este meio foi deixado em repouso *overnight* a 4 °C para a formação do precipitado. Posteriormente, centrifugou-se a amostra a 10000 rpm por 20 min para a recuperação do biossurfactante. Completou-se o precipitado com 8 mL de água deionizada ajustando-se o pH para aproximadamente 8, por ser a melhor condição encontrada para completa diluição do precipitado. Após adicionou-se o mesmo volume de cloreto de metileno para realizar uma extração líquido-líquido, agitou-se a solução por 5 min, e deixou-se em repouso por 1 hora para separação do produto. O procedimento foi repetido três vezes para uma melhor recuperação do produto. O solvente foi evaporado em capela química e o biotensoativo foi resuspendido em metanol para a quantificação da surfactina em HPLC com vazão de 1,0 mL/min à 30 °C, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , onde a detecção foi realizada a 205 nm usando detector UV.

Portanto, até o ano da pesquisa, ainda se encontra uma lacuna na mensuração de biossurfactantes em solos, sendo necessário esta avaliação para verificar as complexas interações entre a matriz do solo, biossurfactantes, microrganismos e contaminantes. Decesaro et al. (2017) apresenta esta deficiência existente em pesquisas que avaliam a biorremediação em conjunto com biossurfactantes, sem que se tenha metodologias definidas para a quantificação dos biocompostos em solos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 2 é apresentado o fluxograma geral dos métodos para a pesquisa, que se subdivide em duas etapas.

Figura 2: Fluxograma geral para a metodologia da pesquisa.



#### 3.1 Produção de surfactina através de métodos biotecnológicos

Os biossurfactantes foram produzidos através de três bateladas da fermentação submersa segundo metodologia de Decesaro (2016), utilizando a bactéria *Bacillus methylotrophicus*, pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, previamente isolada de um solo contaminado com óleo diesel, classificado pedologicamente como Latossolo Vermelho Distrófico Húmico (STRECK et al., 2008) e identificada segundo gênero e espécie através do sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S (DECESARO, 2016). Este biossurfactante foi caracterizado como isoformas de lipopeptídios e identificado como surfactina (DECESARO, 2016). Após, foram recuperados e utilizados na construção de curvas padrão de surfactina e na avaliação sobre o crescimento microbiano. Os procedimentos de produção e recuperação são descritos nos itens subsequentes.

### 3.1.1 Caracterização do soro de leite

Para a produção do biossurfactante foi utilizado o soro de leite, o qual foi caracterizado através de análises físico-químicas de proteína (BRASIL, 2006), cinzas, gordura, lactose, sólidos totais, umidade e pH de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008).

### 3.1.2 Manutenção do microrganismo

O inóculo do microrganismo *Bacillus methylotrophicus* foi preparado 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 o microrganismo isolado em meio PCA (*Plate Count Agar*) com a finalidade de multiplicação das células para dar início ao processo fermentativo. Em erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 50 mL do meio PC, o qual foi inoculado com 2 alçadas de colônias em erlenmeyer, com posterior incubação em agitador orbital por 48 h a 30 °C.

### 3.1.3 Preparo do meio de cultivo, inoculação e controles

Inicialmente o soro de leite foi submetido a um pré-tratamento, no qual o pH do mesmo foi ajustado para 4,0 com HCl (1,0 mol/L) com posterior ebulição durante 10 min. Após arrefecimento, o precipitado foi removido por filtração através de algodão, o pH foi ajustado com NaOH (1,0 mol/L) para 7,0 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 disponível para os microrganismos.

O meio de cultivo foi composto por 50 mL do soro de leite e a adição de fonte de nitrogênio, indutor e micronutrientes estudados por Decesaro (2016), que obteve a melhor condição com 0,5 g (1%) de sulfato de amônio, com adição de 0,25 mL da solução de micronutrientes e 1 mL (2%) de óleo de soja. A solução de micronutrientes foi composta por Br: 0,026 g/L, Cu: 0,05 g/L, Mn: 0,05 g/L e Zn: 0,07 g/L, de acordo com Praveesh et al. (2011).

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 5 mL (10% v/v) de inóculo preparado na etapa anterior, apresentando densidade ótica 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 e final para a determinação da tensão superficial do meio. Esta foi determinada na ausência de células, sendo centrifugada a 5000 rpm por 20 min, em centrífuga Quimis<sup>®</sup> (Q222T204), sendo retirado o sobrenadante, e após realizada a leitura da tensão superficial.

### **3.1.4 Determinação da tensão superficial do meio**

A tensão superficial foi utilizada como uma medida da produção de biossurfactantes, e foi determinada com 15 mL de amostra conforme o método do anel *Du-Nuoy's ring*, utilizando tensiômetro, marca Sigma, modelo 702.

### **3.1.5 Precipitação dos biossurfactantes**

Após o processo fermentativo, foi realizada a recuperação do biossurfactante de acordo com Dubey e Juwarkar (2001). O caldo livre de células foi acidificado a pH 2 com HCl (1,0 mol/L), seguido por incubação durante 24 h a 4 °C e depois centrifugado a 3500 rpm durante 15 min.

### **3.1.6 Liofilização do biossurfactante**

Após a precipitação do biossurfactante foi realizada a liofilização (Terroni) através da desidratação das amostras a frio sob vácuo, com acondicionamento da amostra a -40 °C até a posterior utilização do biocomposto.

## **3.2 Amostra de solo**

As amostras de solo foram coletadas em estado deformado e utilizadas para a avaliação da recuperação dos biossurfactantes, na avaliação do biossurfactante sobre o crescimento microbiano através da liberação de CO<sub>2</sub> e nos ensaios da biorremediação. Realizou-se a coleta na área experimental do Centro Tecnológico – CETEC, localizado no Campus I da Universidade de Passo Fundo/RS. Foi necessário reunir 10 kg de solo para a montagem dos experimentos e mantê-lo em local arejado para secagem, em seguida realizado o peneiramento do mesmo.

O solo utilizado nos ensaios foi classificado pedologicamente como Latossolo Vermelho Distrófico Húmico (STRECK et al., 2008), geotecnicamente como argila de alta plasticidade (PRIETTO et al., 2010) e com pH de 5,10 (CECCHIN, 2014).

### **3.3 Padronização de metodologia para mensuração de biossurfactantes em solo**

Para determinação da produção de biossurfactantes em solo foi necessária uma padronização de metodologias, testadas para a determinação da concentração de surfactina. A partir do biossurfactante produzido em laboratório, realizou-se a padronização de metodologias para determinação de biossurfactante em solo.

#### **3.3.1 Confeção da curva padrão de surfactina e mensuração por método de Biureto**

Foi proposta a mensuração através do método de Biureto em virtude da surfactina possuir uma porção proteica, caracterizada pela presença de ligações peptídicas, determinada através da adaptação do método de Biureto (GORNALL et al., 1949). Este procedimento foi realizado para a surfactina produzida em laboratório, que foi diluída em 1:1 de água destilada e álcool etílico 92,80% para se obter a curva padrão que foi estabelecida nas concentrações entre 10 a 500 mg/L.

Em tubos de ensaio, em triplicata, foram adicionados 2,5 mL da amostra previamente diluída, adicionado de 2,5 mL do reagente de Biureto, seguido de agitação. Deixou-se em banho-maria por 15 min a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Para a realização do branco foi utilizado água destilada.

O reagente de Biureto, de acordo com Gornall et al. (1949), foi composto por 1,5 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) dissolvido em 500 mL de água destilada. Adicionado, sob agitação constante, 300 mL de solução de NaOH 10%, e 1g de iodeto de potássio (KI), posteriormente o volume da solução foi completado para 1 L com água destilada.

### **3.3.2 Avaliação da redução da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante**

Para avaliar a relação entre a concentração de biossurfactantes em meio aquoso e a redução da tensão superficial foi elaborada uma curva padrão, para a surfactina produzida em laboratório.

Para tal, foi preparada uma suspensão com biossurfactante em uma concentração de 500 mg/L diluída em 1:1 de água destilada e álcool etílico 92,80%. A solução foi posteriormente agitada por 20 min em agitador magnético. Após a suspensão foi sonicada por 10 min, com o intuito de acelerar a solubilização do biossurfactante.

A partir desta solução resultante foram realizadas diluições sucessivas variando-se de 0,5 a 500 mg/L de biossurfactante, e foi realizada a leitura da tensão superficial de cada solução (ALVES, 2013) como apresentado anteriormente. Assim foi obtida a curva padrão para a surfactina pré-purificada, relacionando a tensão superficial (mN/m) com a concentração (mg/L).

### **3.3.3 Avaliação da recuperação dos biossurfactantes em solo**

A fim de padronizar metodologias para determinação da produção de biossurfactantes em solos através do método de Biureto e tensão superficial, realizou-se testes de extração de biossurfactantes previamente adicionados em solo. O método de extração foi adaptado de Ángeles e Refugio (2013).

Em erlenmeyers foram adicionadas concentrações de 250, 1250 e 2500 mg/kg de surfactina em 10 g de solo estéril com 34% de umidade. Estes ensaios foram deixados em repouso por 72 h a 4 °C para que ocorresse a interação entre o solo e o biossurfactante, e posteriormente realizou-se a extração do biocomposto.

A extração foi realizada com as 10 g de solo adicionados em uma solução 1:1 de água destilada e álcool etílico 92,80% (100 mL de solvente). A solução foi posteriormente sonicada por 10 min com o intuito de acelerar a solubilização do biossurfactante para o meio aquoso. Após os ensaios foram colocados em mesa agitadora por 3, 7 e 10 h a 150 rpm e 25 °C, até o tempo correspondente de cada leitura da amostra, sendo realizado um ensaio sem agitação. As amostras foram filtradas em membrana de celulose 0,22 µm e realizada a leitura da tensão superficial e a determinação pelo método de Biureto, para mensurar os biossurfactantes inicialmente adicionados.

### 3.4 Avaliação da influência da surfactina sobre o crescimento microbiano

Como em alguns estudos relata-se a atividade antimicrobiana da surfactina (SANA et al., 2018; ARAUJO et al., 2016; SEYDLOVÁ et al., 2013; BARROS et al., 2007), realizou-se esta avaliação para verificar se a surfactina produzida em laboratório era capaz de inibir o crescimento de microrganismos. Para tanto, se realizou a determinação da concentração inibitória mínima, a avaliação da respirometria e contagem microbiana para bactérias e fungos presentes no solo.

#### 3.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima

Foi aplicado o método de macrodiluição em tubos conforme norma M7-A6 aprovada pela *Clinical Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS* (ANVISA, 2003), para a determinação da concentração inibitória mínima frente aos microrganismos *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nas concentrações de 31,25, 62,50, 125, 250 e 500 mg/L de surfactina.

Em 20 mL de água destilada foi dissolvido 0,04 g de surfactina produzida em laboratório, resultando em uma solução mãe com 2000 mg/L, sendo homogeneizada em agitador magnético por 20 min e posteriormente autoclavada a 121 °C por 20 min.

Em tubos de ensaio com 4 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) foi realizada diluição seriada a partir da solução mãe e adicionado 17 µL de inóculo de cada microrganismo correspondente a 0,5 da escala nefelométrica de MacFarland, equivalente a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC). Os tubos foram agitados em vortex por 10 seg e colocados em estufa a 37 °C durante 24 h para verificar o crescimento dos microrganismos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. O resultado qualitativo foi expresso em positivo (+) quando houve crescimento e negativo (-) quando ocorreu inibição do crescimento microbiano.

#### 3.4.2 Determinação da liberação de CO<sub>2</sub>

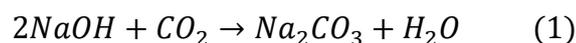
A influência da surfactina sobre o crescimento microbiano também foi analisada através da liberação de CO<sub>2</sub> por um período de 35 dias em 200 g de solo, utilizando a técnica de respirometria, nas concentrações de surfactina adicionadas ao solo de 40, 400 e 4000 mg/kg. As quantidades de surfactina foram diluídas em água destilada estéril suficiente para

correção da umidade ótima do solo (34%). Passados 35 dias dos experimentos, foram retirados 10 g de solo de cada recipiente para realizar-se a contagem microbiana de bactérias e fungos, em que os procedimentos são descritos no item subsequente.

O monitoramento da quantidade de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que foi liberado durante o crescimento dos microrganismos, fornece indícios da atividade dos microrganismos no solo e ajuda na avaliação de possíveis condições limitantes para a respiração microbiana. Para avaliar a produção de CO<sub>2</sub> nos ensaios da avaliação da toxicidade da surfactina, foi utilizada a metodologia de respirometria, adaptado do método respirométrico de Bartha descrito pela NBR 14.283 (ABNT, 1999). Os frascos de respirômetro de Bartha foram mantidos hermeticamente fechados.

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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> resultante da biodegradação reage com o NaOH, no interior do frasco, formando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Quando a mistura de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e excesso de NaOH é adicionada à solução de BaCl<sub>2</sub>, ocorre a reação do Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e do BaCl<sub>2</sub> formando o precipitado BaCO<sub>3</sub>, sequestrando o carbonato e garantindo que o HCl reaja apenas com o NaOH excedente (Equações 1 e 2), permitindo o cálculo da quantidade de CO<sub>2</sub> produzida (COSTA, 2009).

Nos frascos do respirômetro de Bartha foi adicionado 200 g de solo em cada, de acordo com o delineamento experimental apresentado anteriormente em duplicata, e na câmara secundária dos respirômetros foi adicionado 31 mL da solução de NaOH (0,5 mol/L). A cada 2 ou 3 dias foi retirado a solução de NaOH, dos quais foi coletada uma alíquota de 10 mL para um erlenmeyer (125 mL), ao qual foi adicionado 10 mL de BaCl<sub>2</sub> (0,2 mol/L) e 2 gotas de indicador fenolftaleína. Esse precipitado foi titulado com HCl padronizado (0,1 mol/L) para o cálculo da evolução de CO<sub>2</sub>, em duplicata. Após, adicionou-se novamente o NaOH (31 mL), para novas determinações.



Com o volume de HCl gasto na titulação foi possível obter, por estequiometria, a quantidade de CO<sub>2</sub> liberado pelos microrganismos do solo em cada um dos tempos determinados, conforme a Equação 3.

$$C - CO_{2(mg)} = (B - V) \times M \times f \times 6 \times \left(\frac{V_1}{V_2}\right) \quad (3)$$

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 CO<sub>2</sub> que reagem com o NaOH;

V<sub>1</sub>: Volume de NaOH usado na captura de CO<sub>2</sub> (mL);

V<sub>2</sub>: Volume de NaOH usado na titulação (mL);

F: Fator de correção do HCl.

### 3.4.3 Contagem total de microrganismos

A quantificação das bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis foi realizada segundo a metodologia da Instrução Normativa SDA – 62 do Capítulo I (BRASIL, 2003). Em erlenmeyers, foi adicionado 10 g de solo em 90 mL de solução salina peptonada 0,1% e posteriormente agitada. Após, realizou-se diluições sucessivas e o plaqueamento em placas de petri em PCA pela técnica *pour-plate*, acrescentando-se 1 mL das diluições. As placas foram incubadas em estufa a 36 °C por 48 h e, em seguida, contou-se o número de unidades formadoras de colônias, sendo o resultado expresso em UFC/g de solo. O ensaio foi realizado em duplicata.

A quantificação de bolores e leveduras foi realizada segundo a metodologia da Instrução Normativa SDA – 62 do Capítulo II (BRASIL, 2003). Em erlenmeyers, foi adicionado 10 g de solo em 90 mL de solução salina peptonada 0,1% e posteriormente agitada. Após, realizou-se diluições sucessivas e o plaqueamento em placas de petri que continham PDA, acidificado a pH 3,5 utilizando-se ácido tartárico 10%, através da técnica *spread-plate*, acrescentando-se 0,1 mL das diluições. As placas foram incubadas em estufa a 25 °C por 72 h e, em seguida, contou-se o número de unidades formadoras de colônias, sendo o resultado expresso em UFC/g de solo. O ensaio foi realizado em duplicata.

Para a realização da análise de variância dos resultados obtidos na contagem total de microrganismos, estes foram inicialmente normalizados através de normalização logarítmica.

### 3.5 Ensaios de biorremediação

Os ensaios de biorremediação do solo contaminado foram realizados em recipientes de plástico, com 12 cm de diâmetro e 14 cm de altura, com 1 kg de solo seco em cada tratamento, 20% de óleo diesel (m/v) e diferentes concentrações de nutrientes, em temperatura ambiente, de acordo com o delineamento experimental apresentado na Tabela 1, considerando umidade ótima no solo de 34%. Foi realizado o revolvimento do solo a cada 7 dias de forma padronizada, sendo que no restante do período os frascos foram mantidos fechados. Os diferentes tratamentos foram comparados com os ensaios de atenuação natural e controle, durante 60 dias, em duplicata. A concentração de 20% do contaminante foi estabelecida para simular uma biorremediação *ex situ*.

Os tratamentos realizados foram baseados nas características de produção de biossurfactantes através de fermentação submersa, conforme o método descrito no item 3.1, objetivando estimular a produção de surfactina *in situ*. Para a fonte de carbono foram adicionados 20% de óleo diesel (OD – C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>) em relação à massa seca de solo, como fonte de nitrogênio utilizou-se 1% de sulfato de amônio (SA - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em relação à umidade devido ser a condição ideal encontrada na fermentação submersa (DECESARO, 2016), uma vez que é conhecido que a produção de biossurfactantes se dá após o esgotamento da fonte de nitrogênio, sendo necessária, no entanto, para a multiplicação microbiana, para a constituição das moléculas proteicas que compõem a célula microbiana.

Tabela 1: Delineamento experimental dos ensaios de biorremediação.

Trat.	Técnica de biorremediação	Nutrientes	Contaminante
1	Bioaugmentação e bioestimulação	10 % I + 1% SA + 19,90% SL	20% OD
2	Bioaugmentação	10% I + 19,90% H <sub>2</sub> O	20% OD
3	Bioestimulação	10% PC + 1% SA + 19,90% SL	20% OD
4	Atenuação natural	9,90% H <sub>2</sub> O	20% OD
5	Controle	29,90% H <sub>2</sub> O	-

I: Inóculo de *Bacillus methylotrophicus* (9,90 mL/kg); SA: Sulfato de amônio (0,99 g/kg); SL: Soro de leite pré-tratado (99 mL/kg); H<sub>2</sub>O: Água destilada estéril; PC: Meio *Plate Count* estéril (9,90 mL/kg); OD: Óleo diesel (173 mL/kg).

O soro de leite pré-tratado (SL) ou a água destilada estéril (H<sub>2</sub>O) foram adicionados até a umidade ótima ser atingida. Nos ensaios de bioaugmentação, a relação de 10% de inóculo

(I) foi mantida da fermentação submersa, sendo inoculada a bactéria *Bacillus methylotrophicus*. No tratamento 3 (bioestimulação) foi utilizado a mesma quantidade de meio *Plate Count* (PC) utilizado no preparo do inóculo do microrganismo, entretanto, este foi adicionado sem o microrganismo, como um controle. No tratamento 5 (controle, sem biorremediação) foi realizado apenas a correção da umidade com água destilada estéril, para fins de verificar se algum interferente poderia ser extraído do solo, podendo causar influência nos métodos de mensuração dos biossurfactantes. Estes ensaios foram realizados para avaliar como a bioaumentação e a bioestimulação influenciam na produção de biossurfactantes *in situ* e, conseqüentemente, na remoção do contaminante.

Nos ensaios de biorremediação, a mensuração dos biossurfactantes produzidos no solo foi realizada após a extração do solo para o meio aquoso, a cada 15 d. Também foi determinada a contagem microbiana de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis a cada 30 d descrito no item 3.4.3, teor de umidade do solo a cada 30 d, óleos e graxas a cada 30 d e FTIR para o tempo inicial e final. Todas as amostras foram retiradas após revolvimento do solo.

### **3.5.1 Utilização das metodologias de Biureto, tensão superficial e atividade emulsificante para determinação de biossurfactantes em solo**

O método de extração utilizado para avaliar a produção de biossurfactantes durante a biorremediação foi adaptado de Ángeles e Refugio (2013) e através do teste realizado anteriormente neste estudo. Foram retiradas 10 g de solo após revolvimento de cada tratamento da biorremediação (Tabela 1) e adicionado em erlenmeyers com 50 mL de água destilada, após foram colocados em mesa agitadora por 1 h a 150 rpm e 25 °C. Em seguida, foi realizada a filtração da amostra com membrana de acetato de celulose 20 µm para retirada das partículas grosseiras do solo (1ª filtração), e depois com a membrana de celulose 0,22 µm para deixar a solução límpida (2ª filtração). O líquido resultante foi utilizado para verificar a produção de biossurfactantes através da leitura da tensão superficial, método de Biureto e atividade emulsificante.

#### **3.5.1.1 Determinação da atividade emulsificante**

Uma das formas de medir a produção de biossurfactantes é através da atividade emulsificante (AE), que indica a atividade óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) de

acordo com o método de Martins et al. (2006) e Decesaro et al. (2013). Esta atividade foi determinada para os tratamentos da biorremediação após o processo de extração dos biossurfactantes.

Foi adicionado 3,5 mL da amostra extraída e 2 mL de óleo diesel, que é a fase orgânica da emulsão, e a análise foi realizada em tubos de ensaio de 10 mL. Optou-se por realizar a análise apenas com óleo diesel, pois foi o mesmo combustível utilizado na biorremediação, para verificar se ocorreu a produção de biossurfactantes através da formação de emulsão.

A mistura foi agitada em vortex a 700 rpm por 1 min. Após 60 min de repouso, foi realizada a leitura da absorbância do meio emulsificado O/A em espectrofotômetro a 610 nm. A absorbância da atividade emulsificante O/A foi obtida conforme a Equação 4. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura da altura da emulsão A/O formada e da altura total (altura da emulsão, mais a altura da camada remanescente de óleo) utilizando paquímetro. A atividade emulsificante A/O foi calculada através das Equações 5 e 6. Para o controle, foi realizado utilizando-se água destilada no lugar das amostras extraídas.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \quad (4)$$

$$E = \left( \frac{H_{emulsão}}{H_{total}} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (6)$$

Em que:

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

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

ABS: Absorbância;

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

H: Altura.

### 3.5.2 Determinação do teor de umidade

As determinações de umidade dos ensaios de biorremediação em solos foram realizadas conforme a NBR 6.457 (ABNT, 1986), de acordo com a Equação 7, no tempo inicial, 30 d e 60 d da biorremediação com 10 g de solo.

$$Umidade (\%) = \frac{(cápsula + solo \text{ úmido}) - (cápsula + solo \text{ seco})}{(cápsula + solo \text{ úmido}) - (cápsula)} \times 100 \quad (7)$$

### 3.5.3 Análise de óleos e graxas

A determinação de óleo e graxas foi realizada para quantificar a biodegradação do contaminante pelos microrganismos durante o ensaio de biorremediação, de acordo com o método 3350B (USEPA, 1996), no tempo inicial, 30 d e 60 d, com 10 g de solo. O cálculo do teor residual e do percentual de degradação foi calculado conforme a Equação 8.

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

Em que:

P<sub>0</sub>: Quantidade de amostra de solos em peso seco utilizado na análise (g);

P<sub>1</sub>: Peso do balão de fundo chato (g);

P<sub>2</sub>: Peso do balão de fundo chato mais o óleo diesel extraído do solo contaminado (g).

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

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

Em que:

OG<sub>inicial</sub>: Concentração inicial de óleo e graxas;

OG<sub>final</sub>: Concentração final de óleos e graxas.

### 3.5.4 Análise de FTIR

Para acompanhar paralelamente a degradação do óleo diesel foi realizada a análise de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies), utilizando a técnica de Refletância Total Atenuada - FTIR/ATR (BINIARZ et al., 2017; CHIRWA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2014; PICCIN, 2013). As amostras de 5 g de solo

foram retiradas do ensaio de biorremediação após revolvimento, analisadas para o tempo inicial e final. Posteriormente, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho, na faixa de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , escaneado 48 vezes cada espectro com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e o processamento dos espectros foi realizado com o software MicroLab versão B.5 (Agilent Technologies).

Para posteriores comparações da degradação e identificação dos grupos funcionais foi realizada a análise de FTIR para a surfactina bruta e óleo diesel puro.

### **3.6 Tratamento dos dados**

O tratamento dos dados foi realizado através da análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias de Tukey, com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), para comparar as médias entre as amostras, utilizando-se o *Software Statistica 8.0* (STATSOFT, 1999).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de biossurfactantes

A Tabela 2 apresenta a caracterização do soro de leite utilizado para a produção de biossurfactantes e nos ensaios de biorremediação. O soro de leite desnaturado foi coletado em dois momentos após o processo de produção da manteiga.

Tabela 2: Caracterização do soro de leite utilizado na fermentação submersa para produção de surfactina e nos ensaios de biorremediação.

Parâmetro	Quantidade*/Caracterização	
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
Proteína (g/100g)	1,16±0,05	0,99±0,01
Cinzas (g/100g)	0,09±0,01	0,29±0,13
Gordura (g/100g)	0,21±0,03	0,15±0,01
Lactose (g/100g)	4,46±0,15	6,24±0,10
Sólidos totais (g/100g)	6,54±0,15	6,37±0,09
Umidade (%)	92,20±0,17	91,49±0,09
pH	5,11±0,01	6,75±0,08

\*Média ± Desvio padrão, n = 3.

O soro de leite é um líquido que apresenta coloração amarelada com um alto potencial poluidor, devido à sua elevada carga orgânica e difícil biodegradabilidade (DOMINGUES et al., 1999), dificultando o seu tratamento por processos tradicionais. Além disso, este subproduto contém altas cargas de nutrientes, como proteínas, lactose e sais em sua composição, que podem ser reaproveitados para produtos secundários.

A aplicação de soro de leite em processos de produção de biossurfactante já está sendo bem difundido, como apresentado por Decesaro (2016) a sua aplicabilidade em escala laboratorial, agregando valor comercial ao subproduto que seria descartado.

Um dos maiores obstáculos para a utilização do soro de leite é a grande quantidade de lactose presente (aproximadamente 70% dos sólidos totais), a qual contribui para sua baixa solubilidade (SEGUENKA, 2016). Entretanto, a lactose é um tipo de carboidrato muito utilizado como material energético em processos biotecnológicos (NUNES; SANTOS, 2015), favorecendo o seu uso.

Da mesma forma, o microrganismo escolhido para a produção de biossurfactantes utilizando um subproduto agroindustrial, em substituição as fontes tradicionais, deve ser capaz de consumir a lactose e seus produtos de degradação, glicose e galactose (FOX; BALA, 2000). Isto justifica a necessidade do pré-tratamento ácido para este soro de leite, pois o *Bacillus methylotrophicus* não é uma bactéria láctica, ou seja, não utiliza lactose como produto principal do seu metabolismo, sendo fundamental deixar os nutrientes do soro de leite mais disponíveis para uso no metabolismo microbiano, sendo realizado o pré-tratamento com o objetivo de precipitar a proteína e hidrolisar a lactose.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da tensão superficial obtida durante as três bateladas da fermentação submersa com soro de leite utilizando o *Bacillus methylotrophicus*.

Tabela 3: Tensão superficial obtida na produção de biossurfactantes durante as três bateladas da fermentação submersa.

Batelada	Tensão superficial (mN/m)*		Redução (%)
	0 dias	5 dias	
1 <sup>a</sup>	44,27±0,34	42,40±1,33	4,25±2,67 <sup>a</sup>
2 <sup>a</sup>	33,26±0,16	29,01±0,26	12,80±0,94 <sup>b</sup>
3 <sup>a</sup>	40,66±1,92	29,41±0,56	27,57±2,62 <sup>c</sup>

\*Média ± Desvio padrão, n = 3. Letras iguais indicam que não apresentaram diferença significativa (p<0,05) ao nível de 95% de confiança.

Foi necessária a realização de três bateladas da fermentação submersa para se obter a quantidade mínima de surfactina para ser utilizada posteriormente nas padronizações das metodologias de determinação de biossurfactantes e na avaliação da influência da surfactina sobre o crescimento microbiano. Nestas três bateladas ocorreu produção de biossurfactantes, com redução da tensão superficial de 4,25% para a primeira batelada, 12,80% para a segunda e 27,57% para a terceira (Tabela 3).

Essa divergência entre as reduções da tensão superficial entre as bateladas da fermentação submersa pode ter ocorrido devido ao fato dos nutrientes estarem se esgotando e os microrganismos terem utilizado o biossurfactante como fonte de carbono. Além disso, a maior quantidade de lactose presente no soro de leite utilizado na terceira batelada (2<sup>a</sup> caracterização), pode ter influenciado no aumento da excreção de surfactina. Um comportamento semelhante foi verificado por Bautista et al. (2009), na qual cepas de *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Stenotrophomona* sp. utilizaram Tween-80 como única fonte de carbono, tendo a capacidade de metabolizar um surfactante sintético. Esse fato foi

observado, devido ao surfactante ser biodegradável e poder ser usado como fonte de carbono para os microrganismos, competindo com os substratos do meio. Do mesmo modo que a surfactina é um biosurfactante extracelular e biodegradável, ficando livre no meio para interações.

Entretanto, alguns autores indicam que a fonte de nitrogênio desempenha um papel importante na produção de surfactina (FRANÇA et al., 2015; SOUSA, 2012; DAVIS et al., 1999), pois elementos traços de nitrogênio são essenciais para a multiplicação dos microrganismos e produção de biosurfactantes. Pode ter ocorrido, em algum momento da fermentação submersa, o esgotamento da fonte de nitrogênio, reduzindo a produção de surfactina para o meio, devido a primeira e a segunda batelada terem apresentado menor redução da tensão superficial se comparadas a terceira batelada.

Sousa (2012) verificou que a fonte de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de amônio ou nitrato de sódio) exerceu grande influência sobre a produção de surfactina. O autor apresentou que nas primeiras horas de cultivo, a tensão superficial atingiu valores mínimos, correspondendo a maior concentração de surfactina no meio. Após este período, a tensão superficial aumentou em todos os cultivos, que pode ser atribuído à presença de outros compostos tensoativos, tais como proteínas, capazes de competir com a surfactina pela adsorção na superfície do líquido, alterando a tensão superficial. Portanto, a fonte de nitrogênio apresentou grande influência sobre a síntese e excreção da surfactina.

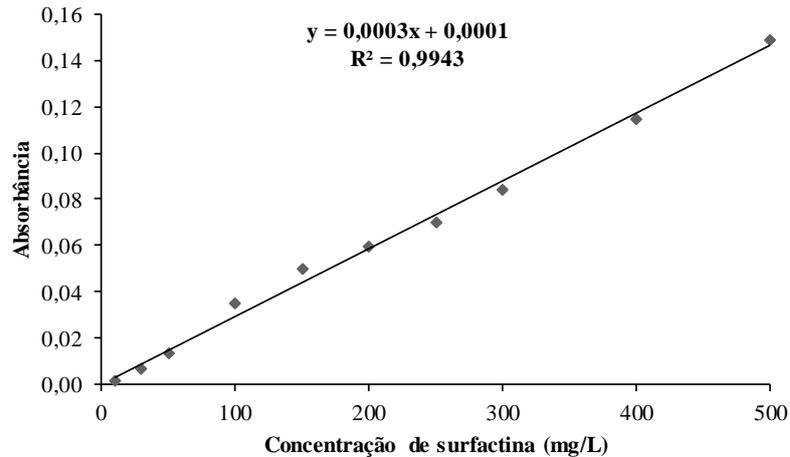
A exaustão de algum nutriente no meio de cultivo ocasionou a limitação da biossíntese de surfactina. Mas como o produto de interesse das bateladas da fermentação submersa era a surfactina, as amostras foram reunidas, resultando em aproximadamente 29,13 g de biosurfactante pré-purificado, bruto. Desta forma, foi alcançada a quantidade de interesse para ser utilizada nas padronizações das metodologias e na avaliação da surfactina sobre o crescimento microbiano.

## **4.2 Padronização de metodologias para determinação de biosurfactantes em solo**

### **4.2.1 Determinação de surfactina por espectrofotometria**

A curva padrão para a determinação da concentração de surfactina através do método de Biureto é apresentada na Figura 3. Estima-se que as concentrações de surfactina no solo não sejam superiores a 500 mg/L, semelhante ao verificado por Ángeles e Refugio (2013), justificando o ponto de maior concentração utilizado na curva padrão.

Figura 3: Curva padrão da surfactina utilizando o método de Biureto.



Verificou-se que há uma relação linear entre a concentração de surfactina (bruta) e a absorvância, sendo o método adequado para mensurar este biocomposto. O método é originalmente utilizado para determinação de proteínas, mas pôde ser aplicado para a determinação de surfactina em função das ligações peptídicas existentes nesta molécula.

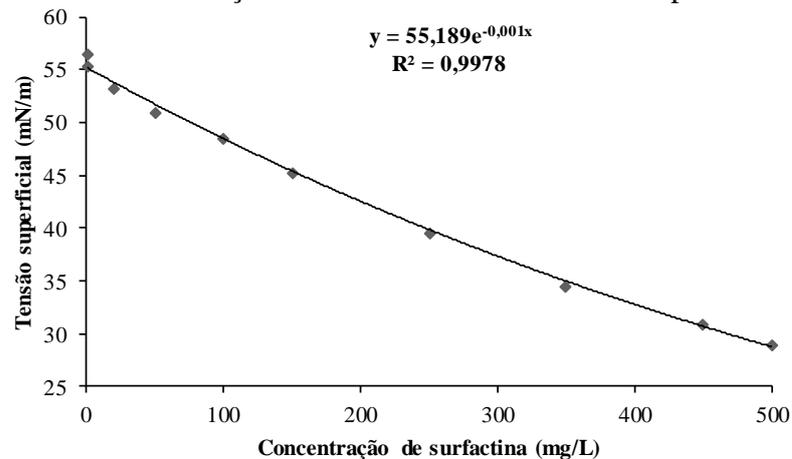
A surfactina é um lipopeptídio, e o reagente de Biureto utilizado na metodologia de Gornall et al. (1949) interage com os peptídios. As ligações existentes na molécula de biureto são muito semelhantes com as ligações peptídicas estabelecidas entre os aminoácidos durante a formação de peptídios e, finalmente, das proteínas (SOUZA; NEVES, 2017; ZAIA et al., 1998). Desta forma, a reação do sulfato de cobre com peptídios e proteínas é a resposta que o método de Gornall et al. (1949) explora. Como trata-se de um ensaio colorimétrico, quanto maior a intensidade da coloração violeta, conseqüentemente, houve maior formação de complexo com ligações peptídicas na amostra através dos íons  $\text{Cu}^{2+}$ .

A surfactina utilizada para a elaboração da curva padrão não era purificada, desta forma foi necessária uma maior concentração de surfactina para estabelecer as faixas de concentrações correspondentes ao biossurfactante quando comparado a outros estudos (MARTINS, 2016; ALVES, 2013; SILVA, 2013; JUNIOR, 2012; BUGAY, 2009) que utilizaram surfactina comercial padrão com 98% de pureza, produzida a partir de *Bacillus subtilis*. Porém nenhum desses estudos utilizou a mesma metodologia deste trabalho para a quantificação do biossurfactante, todos foram relacionados com a redução da tensão superficial.

#### 4.2.2 Relação entre a concentração de surfactina e tensão superficial em meios aquosos

Em virtude de outros estudos (MARTINS, 2016; ALVES, 2013; SILVA, 2013; JUNIOR, 2012; BUGAY, 2009) utilizarem a curva padrão para surfactina a partir da redução da tensão superficial, do mesmo modo foi elaborado esta curva para o biossurfactante produzido via fermentação submersa, sendo a curva padrão obtida apresentada na Figura 4.

Figura 4: Relação entre concentração de surfactina bruta e tensão superficial em meio aquoso.



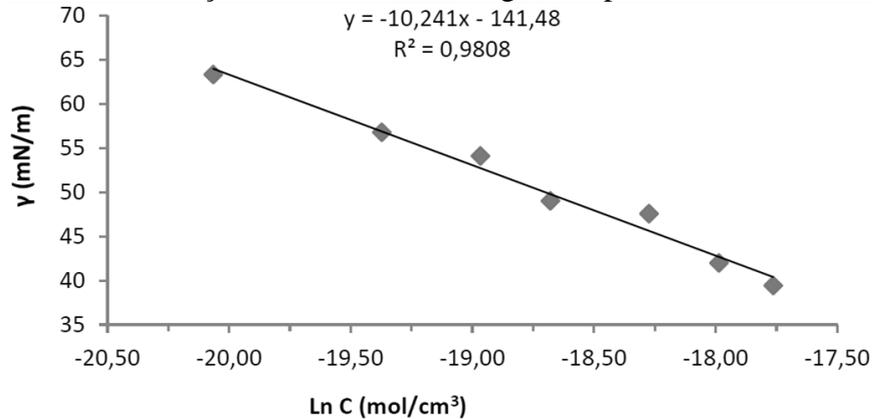
Quando se comparam as concentrações de surfactina utilizadas neste estudo com as usadas em outros estudos (MARTINS, 2016; ALVES, 2013; SILVA, 2013; JUNIOR, 2012; BUGAY, 2009), pode-se verificar que a concentração utilizada é superior aos demais. Martins (2016) utilizou concentrações entre 1 e 10 mg/L para a construção da curva padrão. Isso se deve ao fato, de que a surfactina utilizada não é purificada, e sim, recuperada, justificando a necessidade de uma maior concentração para a elaboração da curva padrão. Além disso, esta surfactina foi diluída em água e álcool, pois foi necessário utilizar o solvente desse biossurfactante para obter-se a redução da tensão superficial. Sabe-se que o álcool apresenta uma baixa tensão superficial, aproximadamente 22 mN/m, o que pode ter causado influência na curva padrão.

Desta forma, para a curva ser representativa para os biossurfactantes que foram extraídos do solo, para não mascarar os resultados da concentração de biossurfactante e o valor da tensão superficial, optou-se por utilizar uma curva padrão obtida na literatura.

Silva (2013) elaborou uma curva padrão com surfactina que apresentava 98% de pureza e massa molar de 1036 g/mol, nas concentrações entre 2 e 20 mg/L, através da medida da tensão superficial pelo método de placa de Wilhelmy, apresentada na Figura 5, definindo-

se a utilização desta curva padrão para a análise dos biossurfactantes que foram extraídos do solo para o presente estudo.

Figura 5: Curva padrão obtida na literatura para a tensão superficial em relação à concentração de surfactina, com grau de pureza de 98%.



Fonte: Silva, 2013 (adaptado).

Silva (2013) preparou uma suspensão de surfactina com água ultrapura, utilizando sonicador em intervalos de 12 h para aumentar a solubilidade do biocomposto em meio aquoso. A partir desta solução foi realizada as diluições nas determinadas concentrações para se obter a curva analítica entre a tensão superficial ( $\gamma$ ) e o logaritmo neperiano da concentração ( $\ln C$ ), expressos em mN/m e mol/cm<sup>3</sup>, respectivamente.

#### 4.2.3 Avaliação da recuperação dos biossurfactantes em solo

O teste de recuperação do biossurfactante foi executado com o intuito de avaliar a eficiência do método em recuperar o biocomposto do solo. Desta forma, foi adicionado ao solo concentrações conhecidas de surfactina para verificar se o método iria recuperar as quantidades inseridas, sendo verificado através dos métodos padronizados em meio aquoso. Neste teste utilizou-se solução 1:1 de água destilada e álcool etílico para a solubilização do biocomposto, e o auxílio do sonicador para desprendimento das partículas do solo. Assim, na Tabela 4 são apresentados os dados obtidos para a extração dos biossurfactantes em solo, utilizando as equações das curvas padrão através da tensão superficial e do método de Biureto.

Tabela 4: Teste de recuperação da surfactina em solo a partir de diferentes tempos de extração.

[S] adicionada (mg/kg)	Tempo de extração (h)	[S] pela TS (mg/kg)*	Recuperação pela TS (%)	[S] pelo MB (mg/kg)*	Recuperação pelo MB (%)
250	0	562,50±0,02	225,00	747,64±231,45	299,06
	3	550,72±0,02	220,29	1121,59±74,60	448,64
	7	577,52±0,02	231,01	2094,78±11,02	837,91
	10	550,72±0,03	220,29	1189,51±85,46	475,80
1250	0	551,62±0,06	44,13	1091,48±85,17	87,32
	3	652,92±0,07	52,23	1677,06±108,64	134,16
	7	559,94±0,02	44,80	2192,48±116,12	175,40
	10	546,26±0,01	43,70	1627,54±233,17	130,20
2500	0	546,43±0,03	21,86	1730,82±65,30	69,23
	3	546,26±0,02	21,85	1726,99±81,62	69,08
	7	558,85±0,02	22,35	2079,38±143,21	83,18
	10	537,26±0,06	21,49	1416,96±43,07	56,68

[S]: Concentração de surfactina; TS: Tensão superficial; MB: Método de Biureto. \*Média ± Desvio padrão, n = 3.

Para os resultados obtidos através da leitura da tensão superficial utilizando a equação da curva padrão (Figura 5), verificou-se que as concentrações encontradas após o processo de extração do biossurfactante adicionado no solo são superiores para a concentração de 250 mg/kg e inferiores às adicionadas para as demais concentrações em todos os tempos. Pode ter ocorrido a influência do álcool etílico para o processo de extração, ocasionando a redução da tensão superficial, visto que, este apresenta uma baixa tensão superficial de aproximadamente 22 mN/m.

Através do método de Biureto utilizando a equação da curva padrão (Figura 3), obteve-se concentrações superiores as adicionadas até 1250 mg/kg. Acredita-se que na extração do biocomposto, foram extraídas outras substâncias, por exemplo, enzimas ou proteínas da parede celular de microrganismos, além do biossurfactante, que superestimou as concentrações de surfactina no solo, devido ao uso do sonicador, por este apresentar alta capacidade de ruptura.

Para as taxas de recuperações obtidas na tensão superficial e através do método de Biureto, pode-se observar uma tendência, de que quanto menor a concentração de surfactina

adicionada ao solo maior foi a sua recuperação, da mesma forma que o contrário também pode ser verificado.

Portanto, foi proposto uma adaptação no método de extração para empregar na biorremediação, utilizando apenas água destilada para a solubilização do biocomposto seguido de agitação, sem o uso de sonificador. Da mesma forma, que se constatou que no tempo inicial (1 hora) de agitação já era suficiente para a homogeneização da amostra, para o biossurfactante passar ao meio aquoso. Posteriormente, esta adaptação na metodologia foi utilizada para as amostras de solo retiradas dos ensaios da biorremediação.

### **4.3 Influência do biossurfactante sobre o crescimento microbiano**

#### **4.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima**

A surfactina tem sido objeto de vários estudos para a descoberta de novos antibióticos, por apresentarem características antibacterianas, antifúngicas e antivirais (ARAUJO et al., 2016; BARROS et al., 2007), devido a produção de lipopeptídios cíclicos que perturbam a integridade da membrana citoplasmática (SEYDLOVÁ et al., 2013). Os biossurfactantes do tipo lipopeptídio penetram na membrana celular microbiana através das cargas negativas, gerando uma variância na carga de ação da superfície da membrana (SANA et al., 2018), danificando o microrganismo. Neste caso, inclui-se a surfactina produzida por cepas de *Bacillus*, especialmente da espécie *subtilis*, considerado um dos biossurfactantes mais poderosos. Desta forma, o biossurfactante produzido neste estudo, foi avaliado frente a concentração inibitória mínima apresentado na Tabela 5, sendo positivo (+) quando houve crescimento e negativo (-) quando ocorreu inibição do crescimento microbiano, com o intuito de avaliar em que concentrações ocorreria a inibição de microrganismos no solo, que poderiam estar envolvidos nos processos de biorremediação.

O *Bacillus methylotrophicus* (gram-positiva) é o próprio produtor do biossurfactante analisado (surfactina), desta forma, era pressuposto que ocorreria o crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas. Todas as bactérias produtoras de antibióticos garantem sua auto-resistência por meio de mecanismos de autodefesa, ativados simultaneamente com a biossíntese dos antibióticos. Isto é provável, devido a membrana citoplasmática ser alvo de surfactina tanto do lado citoplasmático quando extracelular, que é o sítio de auto-resistência contra o biossurfactante, aumentando subseqüentemente à medida que a produção progride (SEYDLOVÁ et al., 2013).

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* (gram-negativa), considerada um microrganismo patogênico, atribuindo-se alta resistência a antibióticos, teve a capacidade de crescer no meio contendo surfactina. Quanto à *Escherichia coli* (gram-positiva) e ao *Staphylococcus aureus* (gram-positiva), que são microrganismos padrões para testes microbianos, também não ocorreu inibição.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima para a surfactina pré-purificada.

Trat.	[S] (mg/L)	Microrganismo			
		<i>Bacillus methylotrophicus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	500	+	+	+	+
2	250	+	+	+	+
3	125	+	+	+	+
4	62,50	+	+	+	+
5	31,25	+	+	+	+

[S]: Concentração de surfactina.

Desta forma, para os quatro microrganismos testados nas cinco diferentes concentrações do biossurfactante (Tabela 5), a surfactina não inibiu o crescimento bacteriano de gram-negativas e gram-positivas. Considerando que se trata de um biossurfactante apenas recuperado do meio de cultivo, não sendo purificado, pode ter havido influência do baixo grau de pureza do biocomposto, apresentando menores concentrações de lipopeptídios que causariam a inibição. Outro fato é que este biossurfactante é proveniente de uma cepa de *B. methylotrophicus*, não apresentando efeito antagonista neste estudo.

Entretanto, Gu et al. (2017) verificaram que mesmo utilizando um lipopeptídio produzido por *Bacillus marinus* com baixo grau de pureza (9,08 e 20,86%) em uma concentração de 500 mg/L, apresentaram zonas de inibição para o fungo *Botrytis cinerea* e obteve-se baixa toxicidade *in vivo* para ratos e coelhos. Lima et al. (2011) afirmam que para ocorrer a inibição através de biossurfactantes do tipo lipopeptídio é necessário utilizar concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), para obter maior eficácia. Vera et al. (2018) avaliaram a produção de um biossurfactante do tipo glicolipopeptídio por *Lactococcus lactis* CECT-4434 utilizando resíduos agroindustriais e a sua ação inibitória. Os resultados obtidos pelos autores na menor concentração de sacarose (1%) e no maior nível de vinhaça (3%) demonstraram maior inibição para a bactéria *S. aureus* CECT-239. Assim, os

autores verificaram que a fonte de carbono utilizada causou interferência na ação inibitória do biossurfactante. Da mesma forma que Silva et al. (2015), utilizando o método de fracionamento de espuma para a recuperação da surfactina, avaliada frente a atividade antimicrobiana em diferentes concentrações, demonstrou ser um agente antimicrobiano. Entretanto, a surfactina não apresentou efeito sobre a bactéria *S. aureus* ATCC-6533, também verificado para este estudo, no qual a surfactina não demonstrou efeito antimicrobiano para esta bactéria.

Fernandes et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana da surfactina produzida a partir de *Bacillus subtilis* utilizando o método de difusão em ágar para cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A atividade contra bactérias gram-positivas foi maior, sendo a cepa de *S. aureus* a mais sensível ao biossurfactante na concentração de 10 mg/L. Sarwar et al. (2018) obtiveram que a surfactina produzida e purificada, apresentou forte atividade antifúngica em diferentes níveis de pH e temperatura. Semelhante ao verificado por Sabaté e Audisio (2013), em que a surfactina manteve a atividade antibacteriana em diferentes níveis de pH e após tratamento térmico contra sete linhagens de *Listeria monocytogenes*, sendo 0,125 mg/mL de surfactina suficiente para ocorrer a inibição deste patógeno. Joe et al. (2012) desenvolveram nanoemulsões à base de surfactina (com concentração final de 3%) sendo avaliada a atividade antibacteriana e antifúngica em produtos alimentares, apresentando para a nanoemulsão a base de óleo de girassol o maior efeito antagônico contra *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, além de alta atividade antifúngica contra *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., respectivamente. Assim, é possível constatar que para diferentes cepas de microrganismos, em diferentes condições de estudo, a surfactina causa efeito antimicrobiano em bactérias e fungos, diferente para o presente estudo que utilizou surfactina pré-purificada.

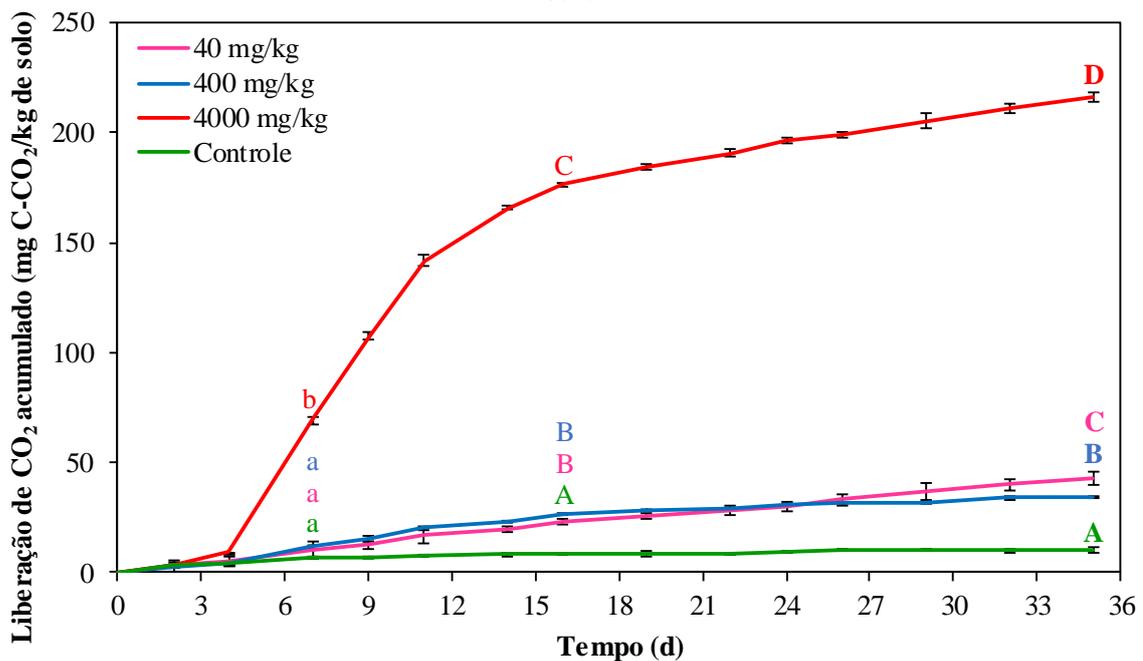
#### **4.3.2 Liberação de CO<sub>2</sub> e contagem microbiana**

Paralelo ao teste da concentração inibitória mínima, foram realizados os experimentos de liberação de CO<sub>2</sub> com diferentes concentrações de surfactina em solo, apresentados na Figura 6, com o intuito de avaliar se o biossurfactante causaria inibição na microbiota do solo.

A medida da taxa respiratória ou atividade microbiana, determinada pela liberação de CO<sub>2</sub> oriundo da respiração de microrganismos durante a degradação de compostos orgânicos, é uma das mais utilizadas (KENNEDY; SMITH, 1995). Conforme os microrganismos do

meio realizam a degradação de compostos orgânicos, liberam  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , sendo que a quantidade de  $\text{CO}_2$  liberada pela respiração microbiana é indicativa da biodegradabilidade dos compostos. Portanto, está técnica de liberação de  $\text{CO}_2$  permite avaliar a degradação dos compostos presentes nos solos através da atividade metabólica dos microrganismos autóctones, pois demonstra o grau de mineralização (DECESARO, 2016).

Figura 6: Liberação de  $\text{CO}_2$  ao longo dos 35 dias de experimento com adição de surfactina no solo.



Letras iguais para cada tempo indicam que não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao nível de 95% de confiança.

É possível verificar através da Figura 6, que a partir de 4 dias de ensaio houve liberação de  $\text{CO}_2$  diferenciada entre os tratamentos. A partir de 5 dias de experimento, houve uma maior liberação de  $\text{CO}_2$ , apresentando maior crescimento microbiano. Possivelmente, nos tratamentos adicionados de surfactina, houve a dissolução do biossurfactante na umidade presente no solo, disponibilizando o composto para as células microbianas.

A adição de 4000 mg/kg de surfactina ao solo ocasionou maior crescimento microbiano e maior quantidade de  $\text{CO}_2$  liberado durante todo o experimento, finalizando os 35 dias de ensaio com 216,29 mg C- $\text{CO}_2$ /kg de solo, significativamente diferente dos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ), indicando que a surfactina pré-purificada adicionada ao solo serviu como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. A surfactina é um lipopeptídico (Quadro 1) que apresenta em sua composição aminoácidos e ácidos graxos, os quais são fontes de nutrientes para os microrganismos. Além disso, a surfactina utilizada não é

purificada, podendo apresentar em sua estrutura outros componentes facilmente assimiláveis pela população microbiana presente no solo.

Os demais tratamentos com 40 mg/kg e 400 mg/kg de surfactina bruta, apresentaram 42,82 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo e 33,92 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo após 35 dias de experimento, respectivamente, sem diferenças significativas entre eles, indicando que em concentrações baixas e médias, a surfactina também serviu como fonte de nutrientes para a microbiota presente no solo, já que o ensaio controle apresentou 9,78 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo após 35 dias de experimento, significativamente menor que os demais ensaios (p<0,05).

Na Tabela 6 é apresentada a contagem dos microrganismos presentes no solo após 35 dias de ensaio de respirometria.

Tabela 6: Contagem total de microrganismos após 35 dias de experimento.

[S] (mg/kg)	Contagem total*			
	Bactérias		Fungos	
	UFC/g de solo	Log UFC	UFC/g de solo	Log UFC
40	1,1x10 <sup>4</sup> ±1,8x10 <sup>3</sup>	4,03±0,07 <sup>a</sup>	6,0x10 <sup>3</sup> ±2,8x10 <sup>3</sup>	3,75±0,21 <sup>a</sup>
400	4,6x10 <sup>4</sup> ±4,9x10 <sup>3</sup>	4,66±0,05 <sup>ab</sup>	1,5x10 <sup>5</sup> ±8,5x10 <sup>4</sup>	5,14±0,26 <sup>b</sup>
4000	1,1x10 <sup>6</sup> ±1,8x10 <sup>5</sup>	6,03±0,07 <sup>b</sup>	4,3x10 <sup>5</sup> ±1,6x10 <sup>5</sup>	5,62±0,16 <sup>b</sup>
Controle	3,9x10 <sup>3</sup> ±4,5x10 <sup>3</sup>	3,35±0,71 <sup>a</sup>	1,5x10 <sup>3</sup> ±7,1x10 <sup>2</sup>	3,15±0,21 <sup>a</sup>

[S]: Concentração de surfactina. \*Média ± Desvio padrão, n = 2. Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa (p<0,05) ao nível de 95% de confiança.

Conforme a concentração de surfactina adicionada no solo foi maior (4000 mg/kg de surfactina bruta) houve aumento na contagem total de bactérias e fungos (Tabela 6), justificando a maior liberação de CO<sub>2</sub> neste tratamento. Apenas no tratamento com 400 mg/kg de surfactina, a população fúngica foi superior a bacteriana, sendo que apenas os tratamentos com 400 e 4000 mg/kg de surfactina apresentaram diferença estatisticamente significativa (p<0,05), diferindo dos demais tratamentos. O tratamento com 40 mg/kg de surfactina e o controle apresentaram a menor população microbiana, porém o controle demonstrou a menor liberação de CO<sub>2</sub> por não apresentar nenhuma adição de nutrientes.

O biossurfactante produzido influenciou em uma maior multiplicação dos microrganismos não havendo ação antimicrobiana no solo, atuando como bioestimulante. É necessário purificá-lo para avaliar de forma mais afirmativa a sua propriedade antibacteriana e antifúngica.

Sarwar et al. (2018) avaliaram a produção de lipopeptídios na rizosfera de arroz, sendo que foi possível constatar que a produção do biocomposto inibiu significativamente o crescimento de *Fusarium moniliforme*. Tian et al. (2016) também investigaram o efeito de um biossurfactante lipopeptídico cíclico produzido por *Bacillus subtilis* e de outros quatro tensoativos sintéticos através da inibição do crescimento de microrganismos indígenas, revelando que o biossurfactante apresentou toxicidade para a população microbiana conforme aumentava a dose do surfactante, principalmente acima da CMC (100 mg/L), influenciando nas propriedades de superfície celular e nas vias metabólicas dos microrganismos.

Whang et al. (2008) durante estudos voltados para a biodegradação de óleo diesel em água e solo através do uso de biossurfactantes, observaram que no sistema óleo diesel/água a presença da surfactina pode limitar a taxa de biodegradação em concentrações superiores a 40 mg/L e com uma inibição completa em 400 mg/L, sendo este valor acima da CMC (45 mg/L). Já no sistema óleo diesel/solo com adição de 40 mg/kg de surfactina, não foi verificado efeitos inibitórios para a população microbiana autóctone, ocorrendo biodegradação do óleo diesel. Nesse estudo, apesar de ser avaliado altas concentrações de surfactina pré-purificada, não foi observado efeito antimicrobiano para a população microbiana presente no solo.

#### 4.4 Ensaio de biorremediação

Durante o período de 60 dias do ensaio de biorremediação, a temperatura ambiente média foi de 26,11 °C, e a umidade média é apresentada na Tabela 7, no qual os ensaios apresentavam umidade inicial de 34%.

Tabela 7: Umidade obtida para os ensaios da biorremediação durante os 60 dias de experimento.

Trat.	Umidade (%)*	
	30 dias	60 dias
1	18,06±0,98	17,11±0,96
2	18,51±0,26	17,57±0,01
3	17,53±0,28	16,35±0,05
4	17,69±0,52	16,93±0,22
5	25,52±0,17	25,36±0,15

\*Média ± Desvio padrão, n = 3. Trat. 1: Bioaugmentação e bioestimulação (10% inóculo + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 2: Bioaugmentação (10% inóculo + H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 3: Bioestimulação (10% meio *Plate Count* + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 4: Atenuação natural (9,90% H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 5: Controle (29,90% H<sub>2</sub>O).

Para os resultados da Tabela 7, observa-se que após 30 dias de experimento, quando comparados a umidade inicial (34%), a mesma reduziu em torno de 50% para a maioria dos tratamentos, exceto para o tratamento 5 que apresentou redução em torno de 25%, isto se deve a uma maior população microbiana ocorrendo liberação de H<sub>2</sub>O para o meio. Na umidade final, após 60 dias, esta manteve-se semelhante ao tempo anterior (30 dias). Esta redução da umidade ao longo do experimento é avaliada como positiva, pois de acordo com Lahel et al. (2016) altos teores de umidade em solos argilosos e arenosos, acabam por preencher os poros do solo com água prejudicando a aeração do solo e afetando gravemente a atividade microbiana posteriormente. Esses dados de umidade foram utilizados para o cálculo da remoção do contaminante.

Em conjunto a biorremediação, foi realizada a contagem de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis, apresentada na Tabela 8 acompanhada do teste de Tukey, para avaliar o crescimento microbiano.

Tabela 8: Contagem de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis durante a biorremediação.

Trat.	Contagem de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas viáveis*					
	0 dias		30 dias		60 dias	
	UFC/g de solo	Log UFC	UFC/g de solo	Log UFC	UFC/g de solo	Log UFC
1	1,6x10 <sup>4</sup> ±1,3x10 <sup>4</sup>	4,11±0,41 <sup>aA</sup>	1,0x10 <sup>4</sup> ±4,0x10 <sup>3</sup>	3,99±0,17 <sup>abA</sup>	1,3x10 <sup>4</sup> ±1,7x10 <sup>4</sup>	3,53±1,23 <sup>aA</sup>
2	2,3x10 <sup>6</sup> ±7,8x10 <sup>5</sup>	6,34±0,15 <sup>bB</sup>	2,8x10 <sup>5</sup> ±0,0x10 <sup>0</sup>	5,45±0,00 <sup>bcB</sup>	1,5x10 <sup>3</sup> ±1,5x10 <sup>3</sup>	3,01±0,55 <sup>aA</sup>
3	3,3x10 <sup>4</sup> ±9,2x10 <sup>3</sup>	4,50±0,12 <sup>aA</sup>	3,1x10 <sup>3</sup> ±3,7x10 <sup>3</sup>	3,19±0,80 <sup>aA</sup>	2,4x10 <sup>3</sup> ±2,9x10 <sup>3</sup>	3,08±0,80 <sup>aA</sup>
4	1,3x10 <sup>6</sup> ±4,8x10 <sup>5</sup>	6,08±0,17 <sup>bC</sup>	1,8x10 <sup>4</sup> ±1,7x10 <sup>4</sup>	4,10±0,53 <sup>abB</sup>	2,2x10 <sup>2</sup> ±2,1x10 <sup>1</sup>	2,33±0,04 <sup>aA</sup>
5	5,9x10 <sup>6</sup> ±4,2x10 <sup>5</sup>	6,77±0,03 <sup>bAB</sup>	3,3x10 <sup>6</sup> ±7,1x10 <sup>4</sup>	6,51±0,01 <sup>cA</sup>	8,0x10 <sup>6</sup> ±2,2x10 <sup>6</sup>	6,89±0,12 <sup>bB</sup>

\*Média ± Desvio padrão, n = 2. Letras iguais (minúsculas para a mesma coluna e maiúsculas para a mesma linha) indicam que não apresentaram diferença significativa (p<0,05) ao nível de 95% de confiança. Trat. 1: Bioaugmentação e bioestimulação (10% inóculo + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 2: Bioaugmentação (10% inóculo + H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 3: Bioestimulação (10% meio *Plate Count* + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 4: Atenuação natural (9,90% H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 5: Controle (29,90% H<sub>2</sub>O).

É possível verificar na Tabela 8, que o número de unidades formadoras de colônias (UFC) para o tratamento 1 foi estatisticamente igual ao longo do experimento, indicando uma boa adaptação dos microrganismos frente ao meio bioestimulado e bioaugmentado. Após 60 dias de biorremediação, os tratamentos 2 e 4 apresentaram os maiores decaimentos da população microbiana, podendo ser devido ao contaminante apresentar toxicidade ou baixa disponibilidade para os microrganismos. A contagem microbiana no tratamento 3 não apresentou diferença entre os tempos inicial e 30 dias (p>0,05). Para o tratamento 5, este não

diferiu estatisticamente durante a biorremediação no tempo inicial e final, devido ser o tratamento controle, não apresentando óleo diesel no meio. Infere-se que ao longo da biorremediação, as maiores cadeias de contaminantes foram rompidas para os microrganismos utilizarem como fonte de carbono e manterem-se ativos no meio, restando as moléculas de cadeias menores sendo mais facilmente assimiláveis pela microbiota.

No tempo inicial, os tratamentos 2, 4 e 5 apresentaram-se estatisticamente iguais, com as maiores contagens de bactérias. Após 60 dias de experimento, apenas o tratamento 5 apresentou-se estatisticamente diferente para os demais tratamentos. O que pode ter causado a redução da população microbiana para os tratamentos bioaumentados e bioestimulados, é devido aos componentes do meio de cultivo adicionados, podendo ter influenciado na inibição do crescimento microbiano, além do contaminante estar adsorvido no solo deixando o hidrocarboneto menos acessível para os microrganismos, verificado através do decaimento bacteriano (Tabela 8). Por isso, torna-se um indício que nem todos os microrganismos encontrados no tempo inicial eram realmente degradadores de hidrocarbonetos, pois com o aumento dos microrganismos capazes de metabolizar o hidrocarboneto haveria diminuição da população bacteriana que não têm essa capacidade, enquanto que alguns microrganismos se mantêm neutros, não sendo afetados nem de forma positiva, nem negativa (NWANKWEGU et al., 2016), alterando a diversidade microbiológica do solo.

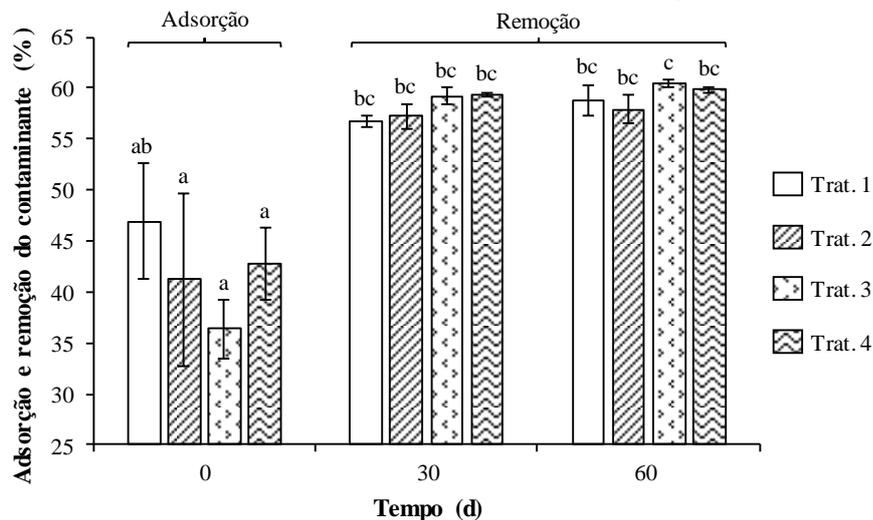
#### **4.4.1 Avaliação da remoção do contaminante**

A Figura 7 apresenta o percentual de remoção do contaminante ao longo da biorremediação, no qual o tratamento 5 não foi avaliado, por este ser o controle não apresentando contaminante (óleo diesel).

Com 30 dias de biorremediação, a atenuação natural (tratamento 4) apresentou a maior taxa de remoção do contaminante com 59,40%. Em 60 dias de experimento o tratamento 3 obteve o maior percentual de remoção do contaminante com 60,48%, visto que na contagem microbiana (Tabela 8) esse tratamento não diferiu estatisticamente entre os tempos inicial e 30 dias ( $p > 0,05$ ). Acredita-se que o bioaumento (tratamento 2) tenha causado uma competição em relação aos microrganismos do solo, por apresentar a menor taxa de remoção (57,92%) após 60 dias de ensaio, semelhante ao tratamento 1 que apresentou 58,80% de remoção do contaminante no mesmo período. Entretanto, observou-se que não houve influência na taxa de remoção do contaminante para os tratamentos bioaumentados e bioestimulados quando comparado a atenuação natural, verificado através da análise de variância em que a variável

remoção do contaminante não apresentou valores de  $p < 0,05$ , logo demonstrou não ter efeito estatisticamente significativo sobre os tipos de tratamentos utilizados na biorremediação após 30 e 60 dias.

Figura 7: Adsorção do contaminante no tempo inicial e remoção deste para os tempos de 30 e 60 dias durante o ensaio de biorremediação.



Letras iguais indicam que não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao nível de 95% de confiança. Trat. 1: Bioaugmentação e bioestimulação (10% inóculo + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 2: Bioaugmentação (10% inóculo + H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 3: Bioestimulação (10% meio *Plate Count* + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 4: Atenuação natural (9,90% H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel).

A estratégia de biorremediação buscando simular as condições de produção de biosurfactantes *in situ* não resultou em maiores taxas de remoção do contaminante, em comparação com a atenuação natural, evidenciando que os microrganismos autóctones presentes no solo eram capazes de remediar o óleo diesel.

Jonsson e Östberg (2011) avaliaram a degradação de fenantreno em solo arenoso contaminado com óleo diesel através da adição de soro de leite doce e soro de leite fermentado. As adições de 210 mg/kg a cada 14 dias de soro de leite fermentado e a adição única de 2100 mg/kg de soro de leite doce, apresentaram melhorias na mineralização do contaminante, sendo de 66 e 71 %, respectivamente, e 46% para o controle (atenuação natural). O efeito da adição de dose única de soro de leite doce foi inovador, pois nem todos os microrganismos do solo podem utilizar facilmente a lactose, porém estes microrganismos podem ter um alto potencial para utilizar o soro de leite e o seu principal componente, a lactose, por ser facilmente degradável. Os autores atribuíram ao lactato e as vitaminas, os efeitos significativos aos estimulantes, para a biodegradação do fenantreno, a partir de microrganismos autóctones do solo. No tratamento em que ocorreu a adição da alta dose de

soro de leite fermentado (2100 mg/kg), provavelmente ocorreu a inibição dos microrganismos e, praticamente, não ocorreu degradação do contaminante.

Östberg et al. (2007) também obtiveram resultados positivos na biodegradação de n-hexadecano em solo arenoso, através da adição de 2200 mg/kg de soro de leite fermentado. Apesar disso, na biodegradação de n-hexadecano, Österberg et al. (2007) concluíram que a adição de soro de leite fermentado pode ser substituído pela adição de lactato, aminoácidos, lactose e vitaminas, pois são os principais constituintes deste subproduto agroindustrial. Observaram também que a maior degradação do contaminante ocorreu através da adição das duas principais fontes de carbono na mistura sintética (lactato e aminoácidos).

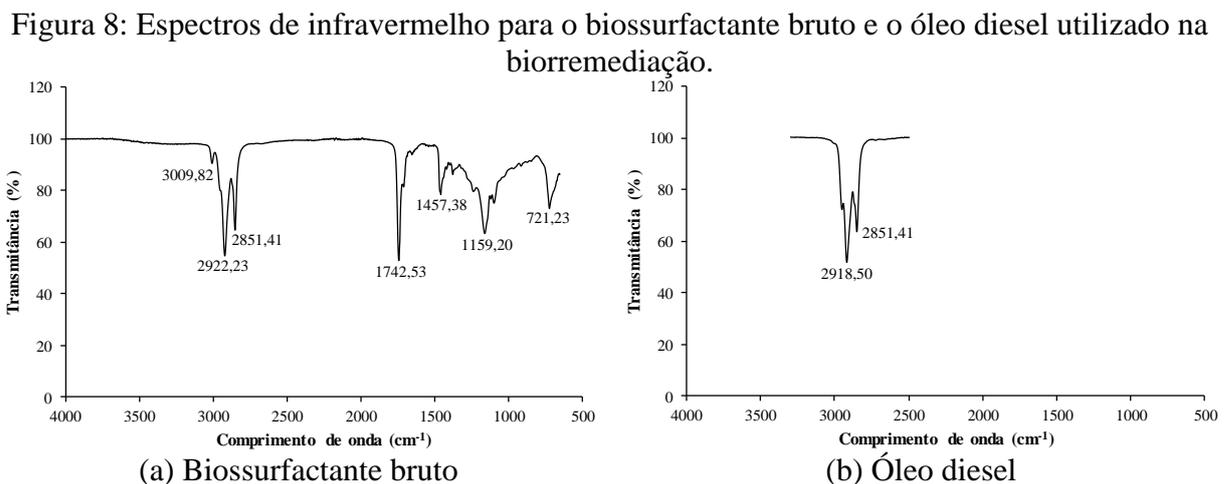
No entanto, a adição de soro de leite ao solo contaminado com óleo diesel influencia na degradação dos compostos de uma maneira muito complexa, podendo apresentar efeito estimulante ou inibidor, dependendo das propriedades do solo e das condições experimentais (ÖSTBERG et al., 2007). Sabe-se do efeito positivo da adição de soro de leite em solos, através do fornecimento de carbono e micronutrientes facilmente acessíveis, que dão origem a um aumento na biomassa microbiana com potencial capacidade de degradar hidrocarbonetos (JONSSON; ÖSTBERG, 2011; ÖSTBERG et al., 2007). Neste estudo, as concentrações adicionadas de bioestimulantes e bioaumento foram baixas, podendo ser este o motivo de não ter se obtido diferenças significativas em relação à atenuação natural.

No tempo inicial da biorremediação, os valores de adsorção do contaminante variaram de 36,34 a 46,94%, devido à adesão do contaminante junto a matriz do solo, não sendo possível a extração pelo método e solvente utilizados, justificando a discrepância entre as réplicas, ocasionando a igualdade entre os tratamentos para a remoção do contaminante. A adsorção do contaminante ao solo pode variar ao longo do tempo, devido ocorrer paralelamente a biodegradação. Desta forma, o meio de cultivo adicionado no solo promoveu diferentes adsorções do contaminante no tempo inicial, pois estas apresentaram-se elevadas se comparada a outros estudos (KRELING, 2017; DECESARO, 2016; CECCHIN, 2014). Assim, as taxas de remoções obtidas podem estar mascaradas em conjunto a retenção do contaminante ao solo.

Cecchin (2014) verificou que o processo mais acelerado de sorção do biodiesel em solo argiloso ocorreu em até 15 dias, comprovando que as interações são mais ativas na superfície mineral do solo. Posteriormente, a sorção subsequente é associada a migração do contaminante para as áreas menos acessíveis na matriz do solo (área internas), resultando em uma redução complementar do contaminante. Lahel et al. (2016) relataram que a sorção física do óleo diesel em solo seco foi de 20,50, 16 e 9,70% para uma concentração de 5.000, 10.000

e 15.000 mg/kg de solo, respectivamente, indicando que o solo tinha capacidade para sorver uma certa quantidade de óleo diesel, especialmente os compostos de argila e húmus presentes no solo. Desta forma, a eficiência de adsorção e dessorção do óleo diesel geralmente é afetada pelo tipo de textura do solo (FALCIGLIA et al., 2011), dado que a matéria orgânica do solo atua como um potencial sorvente (ISHIGURO; KOOPAL, 2016), além de que o solo argiloso tem maior capacidade de absorver hidrocarbonetos em comparação a outros tipos de solos (KAVITHA et al., 2014).

Paralelamente, buscou-se avaliar a degradação do óleo diesel através de análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Inicialmente, foi necessário verificar as bandas de absorção correspondentes ao biossurfactante bruto produzido e ao óleo diesel utilizado na biorremediação, apresentados na Figura 8.



Para o biossurfactante, Figura 8 (a), as bandas de absorção em torno de  $2922,23 \text{ cm}^{-1}$  correspondem as vibrações de alongamento C-H indicando cadeias alifáticas, que podem ser associadas à porção lipopeptídica desta molécula (VERA et al., 2018). A banda  $1742,53 \text{ cm}^{-1}$  indica a ligação C=O dos grupos carbonila, com presença de ligações peptídicas do biossurfactante (JOY et al., 2017). O comprimento de onda em  $1457,38 \text{ cm}^{-1}$  indica a presença de cadeias hidrocarbonadas em  $\text{CH}_2$  (ácidos graxos) de compostos alifáticos. Para as vibrações em torno de  $1159,20 \text{ cm}^{-1}$  representam as ligações C-O que confirmam a presença de ligações glicosídicas formadas entre átomos de carbono e grupos hidroxilo. Bandas de absorção semelhantes foram relatadas por Ohadi et al. (2018), Muthukamalam et al. (2017), Chirwa et al. (2017) e Tian et al. (2016). Assim, com vibrações características das amidas que se encontram na região de  $3250 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  e  $1500 - 1650 \text{ cm}^{-1}$  é específica para o biossurfactante do tipo lipopeptídico (RAMANI et al., 2012).

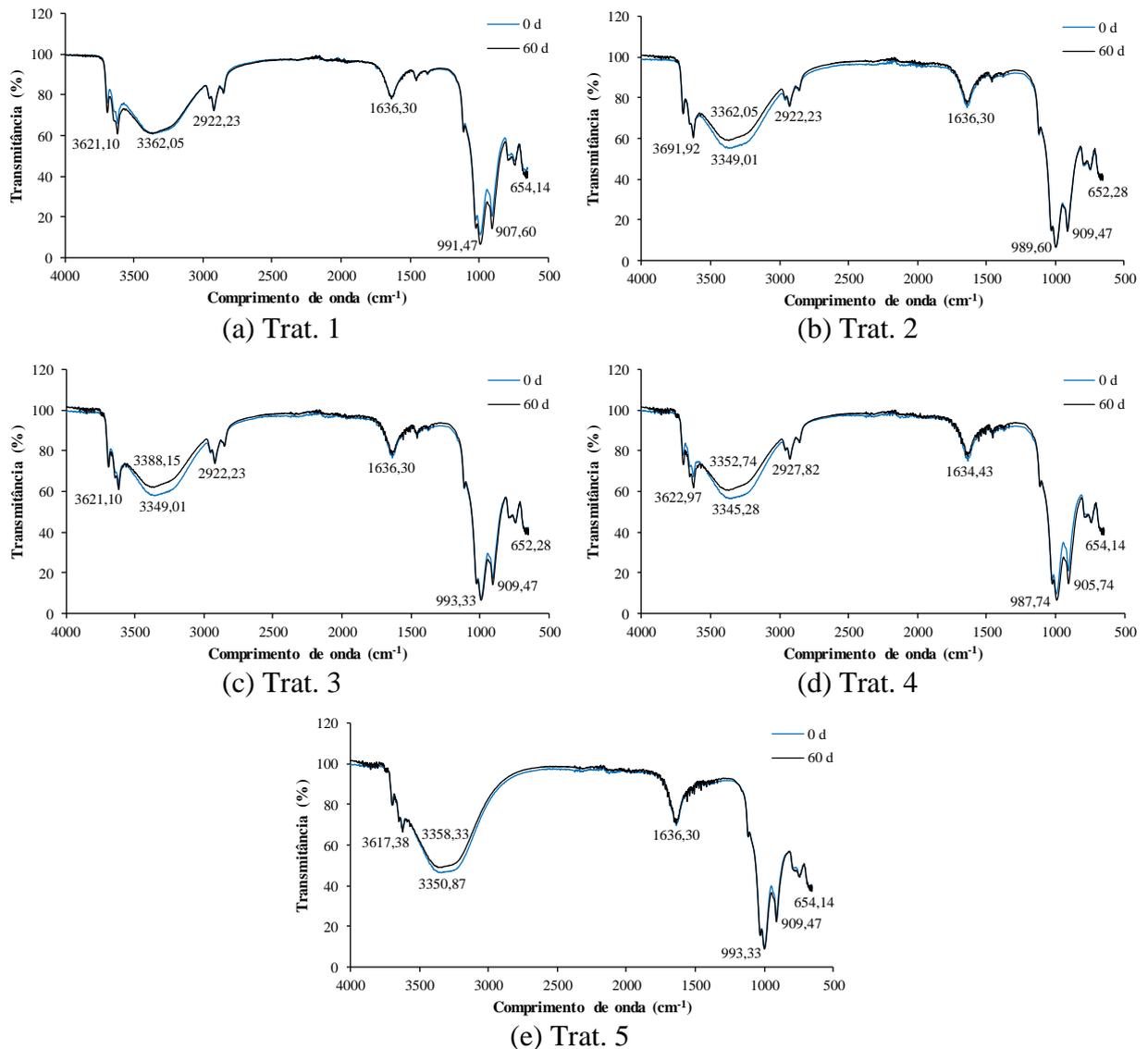
Para o óleo diesel, Figura 8 (b), as bandas de absorção em 2918,50 e 2851,41  $\text{cm}^{-1}$  indicam ligações de C-H alifáticos, correspondendo a carbonos primários e secundários. Este combustível é formado basicamente por carbono e hidrogênio, além de outros átomos como enxofre, nitrogênio, etc. A ausência de bandas intensas na região de 650 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , geralmente, indicam que a estrutura não contém anéis aromáticos (ALISKE, 2010), evidenciando que o óleo diesel brasileiro é composto por hidrocarbonetos não aromáticos. Estas bandas de absorção obtidas para o óleo diesel são semelhantes a alguns estudos de acordo com Ventura et al. (2018) e Luna et al. (2017), entretanto, diferindo para este último em bandas correspondente a ligações C-H para carbonos terciários ( $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ ), no qual não apresentou para o espectro de infravermelho analisado.

Os solos após 60 dias de biorremediação apresentaram as bandas de absorção exibidas na Figura 9.

A análise qualitativa dos espectros de infravermelho (Figura 9) permite inferir que as amostras são similares, apresentando os mesmos picos e bandas, diferindo apenas levemente quanto à intensidade. No tratamento 5, Figura 9 (e), por este não apresentar óleo diesel, conseqüentemente, não apresentou a banda correspondente aos carbonos primários e secundários ( $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ ), aproximadamente entre 2960 – 2850  $\text{cm}^{-1}$ , apresentando apenas as bandas de absorção referente ao solo utilizado na biorremediação. Como o solo apresenta uma constituição complexa, várias bandas foram observadas no espectro, sendo, de modo geral, observados sinais em 3350, 1636, 993 e 909  $\text{cm}^{-1}$ , os quais corroboram com os espectros de infravermelho de Latossolos observados na literatura (FABRIS et al., 2017; TIVET et al., 2013).

Para os tratamentos de 1 a 4, observa-se bandas de absorção com forte intensidade e amplas em torno de 3350  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a frequências de estiramento OH que podem incluir alguma contribuição de água adsorvida na amostra (PARIKH; CHOROVER, 2006), justificando a diminuição da mesma após 60 dias de ensaio, podendo ocorrer devido a redução da umidade no solo. Sugere-se também, que esta redução nos grupos carboxílicos, constituintes dos aminoácidos, é devido a mudanças na estrutura proteica da superfície bacteriana presente no solo (REN et al., 2018), que após 60 dias ocorreu redução da população microbiana, conforme verificado na Tabela 8, e identificado através do espectro de infravermelho. Outro fato, desta redução do estiramento OH, é atribuído a ponte de carboxilato em grupos OH de superfície do solo, pois passado 60 dias de ensaio, estes grupos  $\text{OH}^-$  passam a interagir com compostos  $\text{H}^+$ , tendendo a reduzir o pH do meio, identificando redução deste estiramento no espectro de infravermelho.

Figura 9: Espectros de infravermelho para os tratamentos da biorremediação pelo período de 60 dias.



Trat. 1: Bioaumentação e bioestimulação (10% inóculo + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 2: Bioaumentação (10% inóculo + H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 3: Bioestimulação (10% meio *Plate Count* + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 4: Atenuação natural (9,90% H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 5: Controle (29,90% H<sub>2</sub>O).

Picos em 1636,30 cm<sup>-1</sup> correspondem a ligações C=O de amidas, e bandas de absorção em 993,33 cm<sup>-1</sup> condizem com ligações C-H, da mesma forma que picos em 909,47 cm<sup>-1</sup> referem-se a ligações C-H com anel aromático. A região espectral entre 1300 – 950 cm<sup>-1</sup> também compreendem polissacarídeos e fosfatos. Estiramentos em 652 e 654 cm<sup>-1</sup> também foram observados.

Quando averiguada a produção de biossurfactantes na biorremediação através dos espectros de infravermelho (Figura 9), não é possível verificar a ocorrência do mesmo. Isso é devido ao solo apresentar uma constituição complexa, e a ocorrência da produção de

biossurfactantes ser relativamente em baixas concentrações, não influenciando em picos representativos para induzir que tenha ocorrido a produção do biocomposto. Devido ao óleo diesel ter sido utilizado como única fonte de carbono para o meio, além de ter ocorrido a multiplicação da população microbiana (Tabela 8), estes necessitavam assimilar o hidrocarboneto para a sua subsistência no solo, e conseqüentemente a biodegradação (Figura 7).

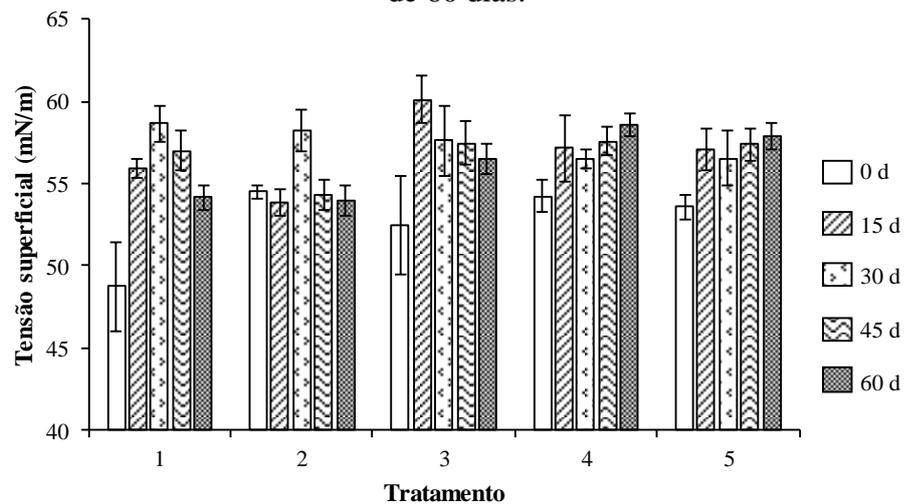
Chen et al. (2016) avaliaram a biodegradação do óleo diesel através de microrganismos imobilizados em material poroso por um período de 3 dias, e dentre as técnicas utilizadas para avaliar a degradação realizou-se o FTIR. Através do espectro obtido constatou-se que o óleo diesel foi degradado e ocorreu a formação de novas bandas, características do processo de degradação, através da formação de metabólitos diferentes do substrato original. Souza et al. (2016) também utilizaram FTIR para avaliar os grupos químicos presentes no óleo diesel/biodiesel degradados pela *Serratia marcescens* após 12 dias de incubação, verificando-se que o microrganismo demonstrou uma significativa diminuição dos picos relacionados as ligações C=O. Liao et al. (2009), utilizando o mesmo método, descobriram que a absorção C=O tende a diminuir com o aumento da biodegradação de asfalto, enquanto que Gassen et al. (2015) verificaram uma redução no pico de absorção da fração carbonilo ( $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$ ) presente no biodiesel após 60 dias, sugerindo a formação de compostos intermediários. Kavitha et al. (2014) também observaram diferenças nos picos de absorção para o petróleo bruto após 48 h de crescimento de *Bacillus licheniformis* em meio aquoso. Diferente para este estudo, no qual não ocorreu mudanças de bandas de absorção para os espectros de infravermelho, e nem formação de novos picos, não refletindo o processo de biodegradação para nenhum tratamento da biorremediação analisado. A degradação do óleo diesel em solo, verificada através do FTIR, pode estar mascarada devido a constituição de biomoléculas semelhantes que causam interferência na identificação dos picos absorvidos.

Desse modo, poucas informações detalhadas são encontradas na literatura sobre o efeito estimulatório ou inibitório do soro de leite, através da biodegradação de óleo diesel em solos, sendo necessárias mais pesquisas para esclarecer o papel do tipo de solo e fatores externos, como temperatura, teor de água e tipo de contaminante, bem como a utilização de espectros de infravermelho para acompanhar a degradação de hidrocarbonetos em solos. Além disto, o soro de leite pode causar aumento na sorção do contaminante na matriz do solo, interferindo no processo de biodegradação, verificado pelo presente estudo.

#### 4.4.2 Avaliação da produção de biossurfactantes em solos

A estimativa da produção de biossurfactantes *in situ* através da análise dos extratos do solo utilizando a medida da tensão superficial é apresentada na Figura 10. A menor tensão superficial foi de 48,71 mN/m para o tratamento 1 no tempo inicial, possivelmente devido ao efeito da adição do bioestímulo e do bioaumento. A menor tensão superficial foi sempre obtida no tempo inicial da biorremediação, o que não significa uma produção *in situ* de biossurfactantes nesse tempo e sim uma influência dos compostos recém adicionados ao solo. Contudo não poderia ocorrer produção de biossurfactantes no tempo inicial, já que os microrganismos ainda não estavam adaptados ao ambiente e não teria ocorrido o esgotamento da fonte de nitrogênio para que a produção do biocomposto acontecesse.

Figura 10: Tensão superficial obtida das amostras extraídas da biorremediação pelo período de 60 dias.



Trat. 1: Bioaugmentação e bioestimulação (10% inóculo + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 2: Bioaugmentação (10% inóculo + H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 3: Bioestimulação (10% meio *Plate Count* + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 4: Atenuação natural (9,90% H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 5: Controle (29,90% H<sub>2</sub>O).

Desta forma, foi possível verificar que a tensão superficial para os cinco tratamentos avaliados em todos os tempos de extração, apresentaram pouca variação. A menor tensão superficial obtida foi para o tempo inicial, da mesma forma que outros biossurfactantes com propriedade tensoativa poderiam agir na redução da tensão superficial, não apenas a surfactina que era o biocomposto de interesse no estudo.

É possível observar na Figura 10, que os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram queda da tensão superficial entre 30 e 60 dias, podendo indicar um início da produção de biossurfactantes. Enquanto que os tratamentos 4 e 5, apresentam aumento da tensão

superficial após 30 dias. Assim, a partir dos dados de tensão superficial, aplicou-se na equação da curva padrão (Figura 5) para obter os dados em mg/L, e depois calculou-se a concentração do biossurfactante para o solo (mg/kg) apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Concentrações de surfactina obtidas a partir da tensão superficial para as amostras extraídas durante a biorremediação.

Trat.	Análise*	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
1	[S] (mg/L)	9,37±2,73	4,41±0,18	3,38±0,38	3,99±0,34	5,25±0,05
	[S] (mg/kg)	46,83±13,63	22,03±0,91	16,92±1,92	19,95±1,72	26,23±0,24
2	[S] (mg/L)	5,06±0,22	3,63±2,17	3,54±0,38	5,18±0,25	5,34±0,04
	[S] (mg/kg)	25,30±1,09	18,17±10,84	17,68±1,89	25,88±1,23	26,68±0,21
3	[S] (mg/L)	6,38±2,28	2,95±0,38	3,74±0,12	3,63±0,49	4,18±0,18
	[S] (mg/kg)	31,89±11,38	14,75±1,88	18,71±0,58	18,14±2,47	20,88±0,88
4	[S] (mg/L)	5,22±0,62	3,86±0,50	4,18±0,12	3,75±0,05	3,40±0,04
	[S] (mg/kg)	26,11±3,08	19,29±2,52	20,89±0,59	18,74±0,27	17,01±0,20
5	[S] (mg/L)	5,55±0,27	3,93±0,10	4,18±0,59	3,83±0,03	3,63±0,09
	[S] (mg/kg)	27,75±1,35	19,67±0,51	20,90±2,95	19,15±0,14	18,13±0,43

[S]: Concentração de surfactina. \*Média ± Desvio padrão, n = 2. Trat. 1: Bioaugmentação e bioestimulação (10% inóculo + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 2: Bioaugmentação (10% inóculo + H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 3: Bioestimulação (10% meio *Plate Count* + 1% sulfato de amônio + soro de leite pré-tratado + 20% óleo diesel); Trat. 4: Atenuação natural (9,90% H<sub>2</sub>O + 20% óleo diesel); Trat. 5: Controle (29,90% H<sub>2</sub>O).

Através da Tabela 9, é possível constatar que com o passar do tempo da biorremediação, a quantificação dos biossurfactantes que teriam capacidade de reduzir a tensão superficial do meio, manteve-se semelhante ao tempo inicial e ao tratamento 5 (controle), em que não teria ocorrido produção de biocompostos. Entretanto, sabe-se que a água apresenta tensão superficial de aproximadamente 72 mN/m, e para os dados obtidos após a extração dos biossurfactantes, apresentou-se valores inferiores a este, podendo ser ocasionado por moléculas de fosfatos os quais encontram-se no solo e tem propriedade tensoativa, podendo o fósforo se dissolver na amostra extraída do solo, mascarando os resultados obtidos para a tensão superficial.

Posteriormente, avaliou-se a extração dos biossurfactantes da biorremediação através do método de Biureto. Entretanto, as concentrações encontradas tiveram relevantes variações, podendo ser ocasionado devido ao método identificar moléculas de proteínas que não fossem de interesse neste estudo, como é o caso de biomassa microbiana e matéria orgânica do solo,

sendo carregadas através da amostra extraída do solo, causando interferências no método de leitura, não sendo possível padronizá-lo. É plausível afirmar que o método de Biureto não deve ser utilizado para amostras extraídas do solo. Uma vez que, em geral, as proteínas são fortemente adsorvidas em solos, especialmente em argilas (HELASSA et al., 2009), além do biossurfactante.

Para os resultados obtidos através da atividade emulsificante em O/A e A/O, não se constatou a produção de biossurfactantes. Desta forma, também foi possível verificar que as amostras extraídas da biorremediação, para todos os tratamentos e em todos os tempos de extração, não continham biossurfactantes em quantidade suficiente para interagir com o óleo diesel e formar emulsões.

Considerando que houvesse extração de biossurfactantes em pequenas concentrações, os métodos de avaliação dos biocompostos deveriam ser contrapostos através da utilização de análises cromatográficas por apresentarem mais sensibilidade e maior especificidade na molécula de interesse, assim como aprimorar a técnica de extração dos biossurfactantes e seus métodos de mensuração.

Ángeles e Refugio (2013) avaliaram a produção de raminolipídio produzidos *in situ* em solo contaminado com hidrocarbonetos. Para o biossurfactante avaliado através de ramnose, observando-se que no tempo inicial (0 dias) de experimento, foi obtido aproximadamente 2 mg/kg de raminolipídio, não variando muito ao longo dos 10 dias da biorremediação para o tratamento bioestimulado e bioaumentado. Para a análise da tensão superficial das amostras extraídas do solo, também não se observa muitas variações em relação ao tempo inicial e não se apresenta uma única tendência para os dados, mesmo quando avaliado para o tratamento controle que obteve aproximadamente 65 mN/m para o tempo inicial. Entretanto, neste estudo de Ángeles e Refugio (2013), não é apresentado um teste inicial para verificar a metodologia utilizada através da adição de concentrações conhecidas de raminolipídios. Desta forma, não se sabe com clareza se os biossurfactantes quantificados já estavam presentes no solo, ou se algum componente poderia ter causado interferência, semelhante ao verificado pelo presente estudo.

Outro método de extração foi desenvolvido e validado por González et al. (2010), que determinou poluentes orgânicos em solos (sulfonato de alquilbenzeno linear, etoxilatos de nonilfenol e bis-(2-etilhexil)ftalato). O método baseia-se na extração por sonicator, limpeza por extração em fase sólida e determinação por cromatografia, com taxas de recuperação superiores a 60% em amostras de solo. González et al. (2012) aplicaram a mesma metodologia para avaliar sulfonato de alquilbenzeno linear e compostos nonilfenólicos em

solo, obtendo recuperações de 78 a 103%. Então, Li et al. (2017) aplicaram este método para a quantificação de 120 mg/kg de surfactantes em solo argiloso, entre eles o raminolipídio. No tempo inicial (0 dias) de experimento não se obteve a concentração inicial adicionada, obtendo-se 116,45 mg/kg de raminolipídio, correspondendo a 97,04% de recuperação, sendo justificado que o biocomposto poderia ter ficado adsorvido no solo. Portanto, indiferente do método utilizado para a extração de compostos do solo, sempre ocorrerá interferências de outros compostos presentes no meio ou até mesmo a adsorção do componente de interesse.

Ishiguro e Koopal (2016) relatam a adsorção de surfactantes sintéticos em diferentes tipos de solos, sejam eles aniônicos ou catiônicos. A surfactina é um biossurfactante catiônico, e apesar de ser biodegradável, acredita-se que esta biomolécula também sofra adsorção em solos. Desse modo, é possível que ocorra mais uma interferência na forma de extração dos biossurfactantes, pois além deste ter que ficar solúvel no meio aquoso para a sua mensuração, também deverá ocorrer quebras nas ligações entre o biossurfactante e o solo, para ser verdadeiramente mensurado. Assim, ainda é necessário melhor esclarecer as verídicas relações existentes entre o solo, microrganismos, biossurfactantes e contaminante, para fins de quantificação do biocomposto.

## 5 CONCLUSÕES

Através da produção de biossurfactantes em fermentação submersa utilizando soro de leite como meio de cultivo, foi possível alcançar a quantidade de interesse de surfactina, para utilizar o biocomposto nas padronizações das metodologias e avaliação do efeito antimicrobiano.

O biossurfactante não apresentou efeito antimicrobiano sobre o crescimento de microrganismos em tubos ou no solo. A maior liberação de CO<sub>2</sub> acumulado foi obtida com a adição de 4000 mg de surfactina/kg de solo, ocasionando aumento na população microbiana, inferindo-se que a surfactina adicionada no solo serviu como bioestimulante para os microrganismos.

Não foi possível avaliar a produção de biossurfactantes *in situ* através da determinação da fração proteica da surfactina pelo método de Biureto. A produção *in situ* de biossurfactante é complexa de ser avaliada, e necessita de aprimoramentos no método de extração e na sua posterior quantificação.

No ensaio de biorremediação para os tratamentos bioaumentados e bioestimulados, estes não apresentaram redução significativa na taxa de remoção do óleo diesel quando comparados a atenuação natural (59,82%), na qual a máxima biodegradação foi para o tratamento bioestimulado com 60,48% ao final de 60 dias de experimento.

Desta forma, a estimulação *in situ* da produção de surfactina a partir das relações utilizadas na fermentação submersa, não é apropriada para uma concentração de 20% de óleo diesel em solo argiloso, visto que uma alta taxa de contaminante ficou adsorvido ao solo, superestimando o efeito da biodegradação realizada pelos microrganismos autóctones.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De forma a aperfeiçoar os resultados obtidos para a avaliação da produção de biossurfactantes *in situ* e na remoção do contaminante durante a biorremediação, sugere-se para trabalhos futuros:

- a) Avaliar quantitativamente a influência da surfactina sobre o crescimento microbiano;
- b) Avaliar a influência da adição de soro de leite (com e sem pré-tratamento) em solo através da respiração microbiana;
- c) Aumentar a relação de nitrogênio adicionado na biorremediação, para corresponder a relação de C:N:P:K necessária para uma bioestimulação;
- d) Aperfeiçoar o método de extração de biossurfactantes em solos;
- e) Avaliar a produção de biossurfactantes *in situ* em conjunto com análises cromatográficas;
- f) Aumentar a escala da biorremediação;
- g) Avaliar a remoção do contaminante em diferentes tipos de solos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Amostras de solo – Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização**. NBR 6.457. Rio de Janeiro, 1986.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Resíduos em solos – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. NBR 14.283. Rio de Janeiro, 1999.
- ALI, N.; DASHTI, N.; AL-MAILEM, D.; ELIYAS, M.; RADWAN, S. Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 812-820, 2012.
- ALISKE, M. A. **Medidas de espectroscopia no infravermelho médio para a determinação do teor de biodiesel em óleo diesel**. 2010. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- ALVES, A. P. C. **Concentração em coluna de bolhas e espuma de surfactina obtida a partir de *Bacillus sp* ITP - 001 isolado de solo contaminado por petróleo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.
- ÁNGELES, M. T.; REFUGIO, R. V. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 595-605, 2013.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2017**. Rio de Janeiro, 263 p., 2017.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada – Sexta edição**. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI/NCCLS, 6º ed., v. 23, n. 2, 2003.
- ANTIZAR-LADISLAO, B.; LOPEZ-REAL, J.; BECK, A. J. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 459-468, 2006.
- ARÁUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- ARAUJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; MARQUITA, R. L. S.; SANTIAGO, V. M. J.; SOUZA, M. P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactina: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171-178, 2016.
- BACOSA, H. P.; SUTO, K.; INOUE, C. Degradation potential and microbial community structure of heavy oil-enriched microbial consortia from mangrove sediments in Okinawa, Japan. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 48, p. 835-846, 2013.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BAUTISTA, L. F.; SANZ, R.; MOLINA, M. C.; GONZÁLEZ, N.; SÁNCHEZ, D. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 913-922, 2009.

BINIARZ, P.; ŁUKASZEWICZ, M.; JANEK, T. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 393-410, 2017.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.

BR – Petrobras Distribuidora. **Óleo diesel**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/paralocomotivas/oleodiesel>>. Acesso em: 30 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Instrução normativa nº 62, de 26/08/2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. 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**, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA. **Resolução nº 273, de 29 de novembro de 2000**. Estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição.

BUGAY, C. **Biosurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CECCHIN, I. **Sorção e migração de biodiesel em um latossolo argiloso**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia: Infraestrutura e meio ambiente) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

CETESB – Companhia Ambiental Do Estado de São Paulo. **Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 14 p., 2017.

CHEN, Y.; YU, B.; LIN, J.; NAIDU, R.; CHEN, Z. Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. **Chemical Engineering Journal**, v. 289, p. 463-470, 2016.

CHEN, W-C.; JUANG, R-S.; WEI, Y-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015.

CHIRWA, E. M. N.; MAMPHOLO, C. T.; FAYEMIWO, O. M.; BEZZA, F. A. Biosurfactant assisted recovery of the C<sub>5</sub>-C<sub>11</sub> hydrocarbon fraction from oily sludge using biosurfactant producing consortium culture of bacteria. **Journal of Environmental Management**, v. 196, p. 261-269, 2017.

CHRZANOWSKI, L.; OWSIANIAK, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; STANIEWSKI, J.; LISIECKI, P.; CIESIELCZYK, F.; JESIONOWSKI, T.; HEIPIEPER, H. J. Interactions between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of a model hydrocarbon-rich effluent. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 605-611, 2011.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista de Ciência Exatas Aplicadas e Tecnológicas**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

COSTA, M. R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro**. 2009. Dissertação (Mestre em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n.6, p. 1675-1684, 2008.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322-329, 1999.

DECESARO, A. **Produção de biossurfactantes a partir de resíduos da indústria de laticínios para aplicação em processos de biorremediação**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia: Infraestrutura e meio ambiente) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

DECESARO, A.; MACHADO, T. S.; CAPPELLARO, A. C.; REINEHR, C. O.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 20831-20843, 2017.

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.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**, v. 7, p. 173-180, 2004.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. **Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo**. Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica, Braga-Portugal, p. 1-10, 1999.

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

FABRIS, M.; CARRA, J. B.; TONIAL, L. M. S. FTIR e quimiometria no estudo dos efeitos do tratamento térmico sobre a composição de um Latossolo. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 12, n. 1, p. 30-37, 2017.

FALCIGLIA, P. P.; GIUSTRA, M. G.; VAGLIASINDI, F. G. A. Low-temperature thermal desorption of diesel polluted soil: Influence of temperature and soil texture on contaminant removal kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 392-400, 2011.

FEAM – Fundação Estadual do Meio Ambiente. **Inventário de áreas contaminadas de Minas Gerais: 2016**. Belo Horizonte: Feam, 51 p., 2015.

FERNANDES, P. A. V. **Produção, extração e caracterização de surfactante por *Bacillus subtilis* R14**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. R.; SANTOS, A. F. A. B.; ARAÚJO, A. A.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709, 2007.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biosurfactantes por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

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.

FRANÇA, I. W. L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10-15, 2015.

GASSEN, J.; BENTO, F. M.; FRAZZON, A. P. G.; FERRÃO, M. F.; MARRONI, I. V.; SIMONETTI, A. B. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 541-547, 2015.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas de biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

GONZÁLEZ, M. M.; MARTÍN, J.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Degradation and environmental risk of surfactants after the application of compost sludge to the soil. **Waste Management**, v. 32, p. 1324-1331, 2012.

- GONZÁLEZ, M. M.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Method for the simultaneous determination of the most problematic families of organic pollutants in compost and compost-amended soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 277-285, 2010.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.
- GU, K. B.; ZHANG, D. J.; GUAN, C.; XU, J. H.; LI, S. I.; SHEN, G. M.; LUO, Y. C.; LI, Y. G. Safe antifungal lipopeptides derived from *Bacillus marinus* B-9987 against grey mold caused by *Botrytis cinerea*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, p. 1999-2008, 2017.
- HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. **Bioremediation of contaminated soil**, n. 37, p. 33-51, 1999.
- HARMS, H.; BOSMA, TNP. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 18, p. 97-105, 1997.
- HELASSA, N.; QUIQUAMPOIX, H.; NOINVILLE, S.; SZPONARSKI, W.; STAUNTON, S. Adsorption and desorption of monomeric Bt (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 498-504, 2009.
- INEA – Instituto Estadual do Ambiente. **Gerenciamento de áreas contaminadas do Estado do Rio de Janeiro – Cadastro de áreas contaminadas e reabilitadas**. Rio de Janeiro, 3<sup>a</sup> ed., 2015.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos - coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tigela**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4<sup>a</sup> ed., 1020 p., 2008.
- ISHIGURO, M.; KOOPAL, L. K. Surfactant adsorption to soil components and soil. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 231, p. 59-102, 2016.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- JEONG, S. W.; JEONG, J.; KIM, J. Simple surface foam application enhances bioremediation of oil-contaminated soil in cold conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 164-170, 2015.
- JOE, M. M.; BRADEEBA, K.; PARTHASARATHI, R.; SIVAKUMAAR, P. K.; CHAUHAN, P. S.; TIPAYNO, S.; BENSON, A.; SA, T. Development of surfactin based nanoemulsion formulation from selected cooking oils: Evaluation for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 172-180, 2012.
- JONSSON, A. P.; ÖSTBERG, T. L. The effects of carbon sources and micronutrients in whey and fermented whey on the kinetics of phenanthrene biodegradation in diesel contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 1171-1177, 2011.

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.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon. **Chemical Engineering Journal**, v. 317, p. 232-241, 2017.

JUNIOR, G. A. L. **Obtenção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

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

KAUPPI, S. **Bioremediation of diesel oil contaminated soil and water**. 2011. Dissertation (Environmental Ecology) – Faculty of Biological Environmental Sciences, University of Helsinki, Lahti, 2011.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v. 170, p. 75-86, 1995.

KRELING, N. E. **Produção de biosurfactantes extracelulares por *Saccharomyces cerevisiae* e sua aplicação em biorremediação**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia: Infraestrutura e meio ambiente) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2017.

KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; VENKATESWARLU, K.; LEE, Y. B.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. **Chemosphere**, v. 168, p. 944-968, 2017.

LAHEL, A.; FANTA, A. B.; SERGIENKO, N.; SHAKYA, M.; LÓPEZ, M. E.; BEHERA, S. K.; RENE, E. R.; PARK, H. S. Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 375-385, 2016.

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

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

- LI, G.; LAN, G.; LIU, Y.; CHEN, C.; LEI, L.; DU, J.; LU, Y.; LI, Q.; DU, G.; ZHANG, J. Evaluation of biodegradability and biotoxicity of surfactants in soil. **RSC Advances**, v. 7, p. 31018-31026, 2017.
- LIAO, Y.; GENG, A.; HUANG, H. The influence of biodegradation on resins and asphaltenes in the Liaohe Basin. **Organic Geochemistry**, v. 40, p. 312-320, 2009.
- LIMA, T. M. S.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDRÃO, F. D.; LEÃO, B. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957-2964, 2011.
- LIN, T. C.; PAN, P. T.; YOUNG, C. C.; CHANG, J. S.; CHANG, T. C. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 1487-1496, 2011.
- LUNA, M. D. G.; CRUZ, L. A. D.; CHEN, W. H.; LIN, B. J.; HSIEH, T. H. Improving the stability of diesel emulsions with high pyrolysis bio-oil content by alcohol co-surfactants and high shear mixing strategies. **Energy**, v. 141, p. 1416-1428, 2017.
- MA, K. Y.; SUN, M. Y.; DONG, W.; HE, C. Q.; CHEN, F. L.; MA, Y. L. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 144-151, 2016.
- MARTINS, T. B. **Influência da transferência de oxigênio na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC21332**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61c, p. 721-726, 2006.
- MNIF, I.; MNIF, S.; SAHNOUN, R.; MAKTOUF, S.; AYEDI, Y.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactant. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 14852-14861, 2015.
- MNIF, S.; CHEBBI, A.; MHIRI, N.; SAYADI, S.; CHAMKHA, M. Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 44-53, 2017.
- MNIF, I.; SAHNOUN, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, p. 72-81, 2017.
- MONTASTRUC, L.; LIU, T.; GANCEL, F.; ZHAO, L.; NIKOV, I. Integrated process for production of surfactina – Part 2. Equilibrium and kinetic study of surfactin adsorption onto activated carbon. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 349-354, 2007.

- MOURA, A. A. C. A.; FILHO, R. A. C. Panorama do gerenciamento de áreas contaminadas no Brasil após a Resolução CONAMA 420/09. **Águas Subterrâneas**, v. 29, n. 2, p. 202-212, 2015.
- MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research**, v. 165, p. 363-375, 2010.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 372-378, 2009.
- MUTHUKAMALAM, S.; SIVAGANGAVATHI, S.; DHRISHYA, D.; RANI, S. S. Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 637-647, 2017.
- NEVES, L. C. M.; ISHII, M.; PENNA, T. C. V.; ROBERTO, I. C. Produção e extração de biosurfactantes a partir de cultivo de *Bacillus atrophaeus* em soro de leite. **XVIII simpósio nacional de bioprocessos – SINAFERM**, p. 1-7, 2011.
- NUNES, L.; SANTOS, M. G. Caracterização físico-química de soros obtidos de diferentes tipos de queijos. **Horizonte Científico**, v. 9, n. 2, p. 1-18, 2015.
- NWANKWEGU, A. S.; ORJI, M. U.; ONWOSI, C. O. Studies on organic and in-organic bioestimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. **Chemosphere**, v. 162, p. 148-156, 2016.
- OHADI, M.; DEGHANNOUDEH, G.; FOROOTANFAR, H.; SHAKIBAIE, M.; RAJAEI, M. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 712-719, 2018.
- OLIVEIRA, R. M.; ALVES, F. Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 03, n. 05, p. 1-14, 2013.
- ONUR, G. **Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters**. 2015. Thesis (Master of Science) – Environmental Engineering Department, Middle East Technical University, Turkey, 2015.
- ÖSTBERG, T. L.; JONSSON, A. P.; BYLUND, D.; LUNDSTRÖM, U. S. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 334-341, 2007.
- ÖSTBERG, T. L.; JONSSON, A. P.; LUNDSTRÖM, U. S. Enhanced degradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil by the addition of fermented whey. **Soil & Sediment Contamination**, v. 16, p. 221-232, 2007.

- PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; POLIWODA, A.; SEGET, Z. P. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 9385-9395, 2014.
- PANTSYRNAYA, T.; BLANCHARD, F.; DELAUNAY, S.; GOERGEN, J. L.; GUEDON, E.; GUSEVA, E.; BOUDRANT, J. Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. **Chemosphere**, v. 83, p. 29-33, 2011.
- PARIKH, S. J.; CHOROVER, J. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. **Langmuir**, v. 22, p. 8492-8500, 2006.
- PEREIRA, D. S.; GOMES, R. C.; SEMÊDO, L. T. A. S. Potencial das actinobactérias na biodegradação de hidrocarbonetos. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 5, n. 2, p. 71-96, 2012.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.
- PICCIN, J. S. **Resíduo sólido na indústria coureira como adsorvente alternativo de corantes**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes 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**, v. 4, n. 4, p. 99-103, 2011.
- PRIETTO, P. D. M.; KORF, E. P.; REGINATTO, C.; THOMÉ, A.; CONSOLI, N. C. Comportamento hidráulico e reativo de uma mistura solo-cimento para barreiras de fundo em aterros de resíduos sólidos. **Congresso de Mecânica dos Solos e Engenharia (COBRAMSEG)**, Bahia: UFBA, p. 1-8, 2010.
- RAMANI, K.; JAIN, S. C.; MANDAL, A. B.; SEKARAN, G. Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 254-263, 2012.
- REN, L.; HONG, Z.; LIU, Z.; XU, R. ATR-FTIR investigation of mechanisms of *Bacillus subtilis* adhesion onto variable- and constant-charge soil colloids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 288-295, 2018.
- RIBEIRO, D. L. R.; VERAS, S. T. S.; FILHO, J. G. A. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PALHA, M. L. A. P. F. Acompanhamento por espectroscopia de infravermelho (FTIR) da degradação do diesel e do biodiesel por *Pseudomonas aeruginosa*. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, p. 1-8, 2014.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPINY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology letters**, v. 11, p. 871-874, 1989.

SABATÉ, D. C.; AUDISIO, M. C. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. **Microbiological Research**, v. 168, p. 125-129, 2013.

SANA, S.; DATTA, S.; BISWAS, D.; SENGUPTA, D. Assessment of synergistic antibacterial activity of combined biosurfactants revealed by bacterial cell envelop damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1860, p. 579-585, 2018.

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.

SARWAR, A.; HASSAN, M. N.; IMRAN, M.; IQBAL, M.; MAJEED, S.; BRADER, G.; SESSITSCH, A.; HAFEEZ, F. Y. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. **Microbiological Research**, v. 209, p. 1-13, 2018.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-18, 2010.

SEGUENKA, B. **Produção de concentrado proteico e lactose de soro de leite por processos de separação por membranas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

SEYDLOVÁ, G.; FISER, R.; CABALA, R.; KOZLÍK, P.; SVOBODOVÁ, J.; PATEK, M. Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 2370-2378, 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Surfactin**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3523?lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

SILVA, M. T. S. **Produção e concentração integrada de surfactina a partir de *Bacillus* sp ITP-001 em fracionamento com espuma em semi-batelada**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.

SILVA, M. T. S.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SANTANA, C. C. Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001 by semi-bacth foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p. 91-97, 2015.

SOARES, D. W. F. **Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus* sp. isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará – Brasil)**. 2014. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SORKHOH, N. A.; AL-HASAN, R. H.; KHANAFER, M.; RADWAN, S. S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 78, p. 194-199, 1995.

SOUSA, J. R. **Produção de lipopeptídeos e glicolipídeos a partir da bioconversão do co-produto da produção de biodiesel**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SOUZA, M. M.; COLLA, T. S.; BUCKER, F.; FERRÃO, M. F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 141-146, 2016.

SOUZA, K. A. F. D.; NEVES, V. A. **Experimentos de bioquímica**. 2017. Disponível em: <[http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas\\_proteinas/reacoes\\_coradasdois3.htm](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/reacoes_coradasdois3.htm)>. Acesso em: 30 mar. 2017.

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

STRECK, E. V.; KAMPF, N.; DALMOLIN, R. S. D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P. C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2 ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 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.

TIAN, W.; YAO, J.; LIU, R.; ZHU, M.; WANG, F.; WU, X.; LIU, H. Effect of natural and synthetic surfactants on crude oil biodegradation by indigenous strains. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 171-179, 2016.

TIVET, F.; SÁ, J. C. M.; LAL, R.; MILORI, D. M. B. P.; BRIEDIS, C.; LETOURMY, P.; PINHEIRO, L. A.; BORSZOWSKI, P. R.; HARTMAN, D. C. Assessing humification and organic C compounds by laser-induced fluorescence and FTIR spectroscopies under conventional and no-till management in Brazilian Oxisols. **Geoderma**, v. 207-208, p. 71-81, 2013.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010.

USEPA, U. S. **Environmental Protection Agency**. 1996. Method 3350B. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3350b.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

VALPUESTA, R. R. F. **Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima renovável e de baixo custo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389-397, 2017.

VENTURA, M.; DEUS, W. B.; SILVA, J. R.; ANDRADE, L. H. C.; GATUNDA, T.; LIMA, S. M. Determination of the biodiesel content in diesel/biodiesel blends by using the near-infrared thermal lens spectroscopy. **Fuel**, v. 212, p. 309-314, 2018.

VERA, E. C. S.; AZEVEDO, P. O. S.; DOMÍNGUEZ, J. M.; OLIVEIRA, R. P. S. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 168-178, 2018.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

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

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 724-728, 1998.