

TÂNIA MARIA DA SILVA LIMA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES VISANDO AO TRATAMENTO DE
BORRA OLEOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

TÂNIA MARIA DA SILVA LIMA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES VISANDO AO TRATAMENTO DE
BORRA OLEOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 01 de agosto de 2003.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof^a. Maria Catarina M. Kasuya
(Conselheira)

Prof^a. Ann H. Mounteer

Prof. Maurício Dutra Costa

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

A Deus, por me permitir alcançar uma conquista a mais na minha carreira.

Aos meus pais Vicente (in memoriam) e Maria, pelo amor, pelo apoio e pela compreensão que nunca me faltaram.

Aos meus irmãos pela amizade e pelo carinho.

A minha prima e grande amiga Ilmara Lima.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois não houve um só momento em minha vida que me sentisse abandonada por ele.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, meu orientador, cujos valiosos ensinamentos transmitidos, a paciência, a dedicação e o apoio foram fundamentais para a transposição desta etapa de minha vida.

Aos professores, Arnaldo Chaer Borges e Mauricio Dutra Costa, pelo apoio e ajuda que nunca me foram negados.

Às professoras Maria Catarina Megumi Kasuya, Elza Fernandes de Araújo e Célia Alencar de Moraes, pelos aconselhamentos e por serem tão amigas e prestativas.

Ao professor Luis Henrique Mendes pelo importante auxílio e prestatividade.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho.

A todos os funcionários do BIOAGRO, pela amizade e ajuda no bom funcionamento do laboratório.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia, Nilcéia, Aparecida e Laura, pela amizade e simpatia em nos atender a qualquer momento.

A todos os colegas do laboratório, pela ajuda na parte experimental para a conclusão deste trabalho.

A Andréia Faria pela amizade, apoio moral e ajuda na condução dos experimentos.

À minha mãe Maria Lima, pelo imenso amor dedicado e pelo apoio incansável.

Aos meus irmãos e sobrinhos, por alegrarem a minha vida com sua existência.

À minha prima e grande amiga que mesmo à distância sempre pude contar com seu apoio.

Ao Thiago Veiga pela amizade, compreensão, pelo apoio e pela força nos momentos difíceis que aqui passamos.

À Cássia Tótola, Fernanda Feitosa e Andréa Ribon pela amizade, paciência, compreensão, apoio nos melhores e maus momentos que tive nessa etapa da minha vida.

A todos os colegas do curso, pela amizade, pelos momentos de descontração e pela ajuda nos momentos mais críticos.

Aos verdadeiros amigos que aqui encontrei, Chelen Santos, Antônio Galvão, José Renato, Cláudia Alencar e Daniele Ferreira.

BIOGRAFIA

TÂNIA MARIA DA SILVA LIMA, filha de Vicente de P. Corrêa Lima e Maria da Silva Lima.

Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal do Pará – UFPA, onde, em julho de 2001, graduou-se em Química Industrial.

No período de agosto de 1999 a julho de 2001, foi bolsista do PIBIC/CNPq sob orientação do professor Alberto Cardoso Arruda.

Em abril de 2002, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, na área de Microbiologia Ambiental, com projeto de pesquisa em “Produção de Biossurfactantes Visando ao Tratamento de Borra Oleosa”.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Classificação, Natureza Química e Origem Microbiana dos Biossurfactantes.....	4
2.2. Propriedades Físico-Químicas dos Biossurfactantes.....	8
2.3. Caracterização e Quantificação dos Biossurfactantes.....	9
2.4. Síntese de Biossurfactantes.....	10
2.5. Fatores que Afetam a Produção de Biossurfactantes.....	11
2.6. Aplicação de Biossurfactantes na Indústria do Petróleo.....	12
2.6.1. Biorremediação.....	12
2.6.2. Limpeza de Reservatórios de Óleos.....	14
2.6.3. Recuperação Melhorada do Petróleo (MEOR).....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Coleta da Borra Oleosa.....	17
3.2. Caracterização da Borra Oleosa.....	17
3.3. Isolamento de Microrganismos.....	18
3.4. Triagem dos Isolados Produtores de Biossurfactantes.....	20
3.5. Determinação da Temperatura Ótima de Crescimento dos Isolados Produtores de Biossurfactantes.....	21
3.6. Identificação dos Isolados Produtores de Biossurfactantes.....	21
3.7. Testes para Otimização da Produção de Biossurfactantes.....	22
3.8. Tratamento da Borra Oleosa com os Biossurfactantes.....	24
3.9. Análises Estatísticas.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Caracterização da Borra Oleosa.....	25

4.2. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Biossurfactantes.....	26
4.3. Tensão Interfacial e Concentração Crítica Micelar (CCM).....	29
4.4. Formação e Estabilidade de Emulsão	39
4.5. Tratamento da Borra Oleosa com os Biossurfactantes Obtidos	44
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
APÊNDICE A	55

RESUMO

Lima, Tânia Maria da Silva. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Produção de Biossurfactantes Visando ao Tratamento de Borra Oleosa**. Orientador: Marcos Rogério Tótola. Conselheiros: Arnaldo Chaer Borges, Maria Catarina M. Kasuya e Luis Henrique Mendes da Silva.

O presente estudo objetivou otimizar a produção de biossurfactantes por diferentes culturas bacterianas, em diferentes meios de cultura e com diferentes fontes de carbono, para aplicação no tratamento da borra oleosa sedimentada nos tanques de armazenamento de óleo combustível da RECAP (SP), pertencentes à Petróleo Brasileiro S/A (). Trinta e seis isolados, sendo 15 pertencentes ao Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (BBMA) e 21 isolados da amostra de borra, foram avaliados quanto à produção de biossurfactantes. Dentre os 15 isolados com essa característica, foram selecionados cinco para a realização dos ensaios de otimização da produção de biossurfactantes. Os isolados foram identificados pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) utilizando o sistema Sherlock da Microbial Identification System (MIDI, Newark, DE, EUA) como *Pseudomonas aeruginosa* (88A), *Bacillus subtilis* (155) e *Arthrobacter* sp. (201). Os isolados 111A e 191 não foram reconhecidos pelo sistema Sherlock. A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes nos meios de cultura, após a remoção das células, foi estimada por quantificação da tensão superficial pelo

método de du Nouy. A diluição micelar crítica ficou entre 0,01% e 1% do meio, indicando que as concentrações dos biossurfactantes nos meios estavam de 100 a 10.000 vezes acima de suas CMCs. A estabilidade das emulsões água-querosene, na presença dos biossurfactantes, variou de 30 a 70% após 42 horas, enquanto a estabilidade da emulsão formada pela mistura do surfactante sintético SDS e querosene foi de 45%. A produção de biossurfactantes variou significativamente com a composição do meio de cultura. A borra oleosa foi um indutor efetivo da produção de biossurfactantes. Os biossurfactantes produzidos na fase anterior foram utilizados para tratar a borra oleosa, visando a separação do óleo e do material inerte. O processo mostrou-se altamente eficiente em recuperar o óleo retido, chegando-se a 95% de redução do volume da borra. Os resultados mostraram que a utilização de biossurfactantes para o tratamento de borras oleosas pode ser uma tecnologia econômica e ambientalmente viável, considerando o pequeno volume de cultura microbiana requerido para o tratamento.

ABSTRACT

Lima, Tânia Maria da Silva. Universidade Federal de Viçosa, August, 2003. **Biosurfactant Production for Oily Sludge Treatment.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Committee members: Arnaldo Chaer Borges, Maria Catarina M. Kasuya and Luís Henrique Mendes da Silva

This work aimed at optimizing the production of biosurfactants by bacterial cultures for the treatment of oily sludge from fuel oil storage tanks at Capuava Refinery (RECAP-SP), Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS). Fifteen strains of the belonging to the collection of Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (BBMA) and 21 strains isolated from oily sludge samples were evaluated for biosurfactant production. Among the biosurfactant producing isolates, five were chosen for the optimization of biosurfactant production. The isolates were identified as *Pseudomonas aeruginosa* (88A), *Bacillus subtilis* (155), and *Arthrobacter* sp. (201). The isolates 111A and 191 could not be identified. The critical micelar concentration (CMC) of biosurfactants in the culture media after cell removal was estimated by measuring surface tension of diluted samples by the du Nouy method. The critical micelar dilution ranged from 0.01% to 1%, indicating that the biosurfactant concentration in the medium was 100 to 10.000 times higher than its CMC. The stability of water-kerosene emulsions in the presence of biosurfactants ranged from 30% to 70% after 42 hours, while the stability of the mixture of the synthetic surfactant SDS with kerosene was 45%. The

composition of the culture medium significantly affected the production of biosurfactants. The oily sludge was an effective inducer of biosurfactant production. The biosurfactants produced by the five isolates were used for oily sludge treatment, aiming at the separation of oil from inert materials. The process was highly efficient, resulting in 95% reduction of the oily sludge volume. The results showed that the use of biosurfactants for oily sludge cleanup operations can be an economically and environmentally attractive technology.

1. INTRODUÇÃO

A indústria do petróleo é responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos oleosos e viscosos, que são formados durante as etapas de produção, transporte e refino. A composição desses resíduos, denominados borras oleosas, é muito variável e inclui óleo, sólidos grosseiros e água. As borras oleosas são depositadas no fundo dos tanques de armazenamento, sendo sua remoção onerosa, demorada e dependente de operações posteriores para tornar o seu descarte ambientalmente seguro.

A elevada estabilidade desse sistema multifásico se deve à adsorção do óleo nas partículas sólidas, fenômeno responsável pela formação de uma camada altamente protetora. Essa estabilidade é acentuada pela presença de frações polares no óleo, em especial resinas e asfaltenos, compostos responsáveis também pelos altos valores de viscosidade. Além disso, essa camada cria um ambiente que favorece a corrosão microbiana, e pode abrigar uma alta diversidade de microrganismos viáveis, além de representar um reservatório de contaminação todas às vezes que o tanque for utilizado.

As borras oleosas tendem a reduzir o volume útil dos tanques o que, aliado à possibilidade da ocorrência de corrosão, impõe a necessidade de se remover esse material periodicamente. As estratégias convencionais para tratamento de resíduos da indústria do petróleo apresentam problemas operacionais em razão do alto custo ou da necessidade de pessoal e equipamentos especializados. As formas mais comuns de aplicação da

biotecnologia no tratamento de resíduos da indústria do petróleo, incluindo as borras oleosas, são a compostagem e o “landfarming”. Essas técnicas exploram a atividade microbiana e incorrem em elevados tempos de processo e em riscos acentuados de contaminação do solo e de aquíferos por lixiviação, além de serem altamente sensíveis a variáveis climáticas, demandarem grandes extensões de terreno e monitoramento constante.

Bactérias, leveduras e fungos são capazes de degradar ampla gama de substâncias orgânicas comumente encontradas nos efluentes e resíduos gerados pelas refinarias. Por serem capazes de utilizar tais substâncias como única fonte de carbono e de energia, os microrganismos vêm sendo empregados como formas alternativas aos métodos convencionais de tratamento de resíduos do petróleo.

A remoção das borras oleosas de tanques de armazenamento pode ser realizada por um processo alternativo envolvendo o uso de biossurfactantes, que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água. Esse processo facilita o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão. Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, encontradas principalmente na superfície de células microbianas ou excretadas para o meio de cultura por uma ampla variedade de microrganismos. Os biossurfactantes atuam na redução da tensão interfacial entre moléculas individuais, o que resulta em aumento das concentrações aquosas de compostos pouco solúveis, tornando-os mais disponíveis aos microrganismos.

O interesse pelos biossurfactantes tem aumentado em função de sua diversidade, da possibilidade de sua produção por processo de fermentação e do seu potencial de aplicação na limpeza de ambientes contaminados com diferentes tipos de poluentes e na recuperação do óleo cru. Os principais aspectos que motivam o estudo dos biossurfactantes são, resumidamente: (i) novos tipos de estruturas podem ser produzidos ampliando a diversidade de biossurfactantes disponíveis; (ii) eles são normalmente biodegradáveis e de baixa toxicidade; (iii) podem ser mais eficazes que os surfactantes sintéticos sob condições extremas de pH, de temperatura ou de salinidade; e (iv) podem ser sintetizados a partir de substratos de baixo custo.

O tipo, a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por um microrganismo são influenciados por fatores tais como: (i) a natureza da fonte de carbono; (ii) as concentrações de nutrientes como N, P, Mg, Fe, S e Mn no meio; e (iii) as condições de crescimento tais como pH, temperatura, agitação e concentração de oxigênio disponível.

A caracterização dos biossurfactantes e os requerimentos físico-químicos para a sua produção têm sido objetos de vários estudos. Porém, são poucas as avaliações de seu desempenho em processos de limpeza de tanques de armazenamento. A proposta deste estudo foi a de otimizar a produção de biossurfactantes por diferentes culturas bacterianas crescidas em diferentes fontes de carbono, com aplicação em limpeza da borra oleosa sedimentada em tanques de armazenamento de óleo combustível.

2. REVISÃO DE LITERATURA

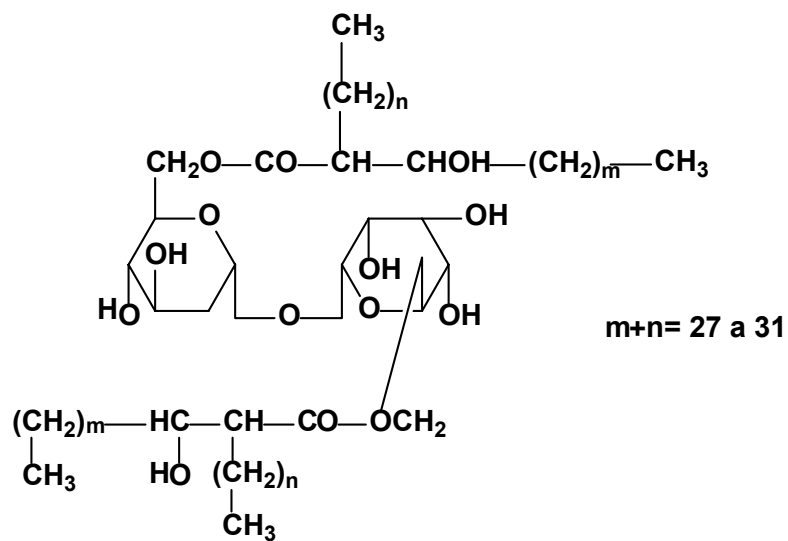
2.1. Classificação, Natureza Química e Origem Microbiana dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades tensoativas e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. As principais classes de biossurfactantes são os glicolipídios, os lipopeptídios e lipoproteínas, os fosfolipídios e os ácidos graxos, os surfactantes poliméricos, constituídos por diversos grupos químicos diferentes (Figura 1) e surfactantes particulados, produzidos em vesículas extracelulares por *Acinetobacter* sp. (DESAI *et al.*, 1997). Algumas bactérias e leveduras excretam compostos iônicos que emulsificam hidrocarbonetos no meio de crescimento, tais como os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e os sofrorolipídios produzidos por espécies de *Torulopsis* e por *Candida bombicola* (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; LANG, 2002). Outros produtores de biossurfactantes eficazes são *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas rubescens*, *Gluconobacter cerinus* e *Thiobacillus ferrooxidans* (KARANTH *et al.*, 1999). Ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são comercializados para uso em aplicações ambientais. A mais notável foi a testada no Alasca quando o navio petroleiro Exxon Valdez, ao

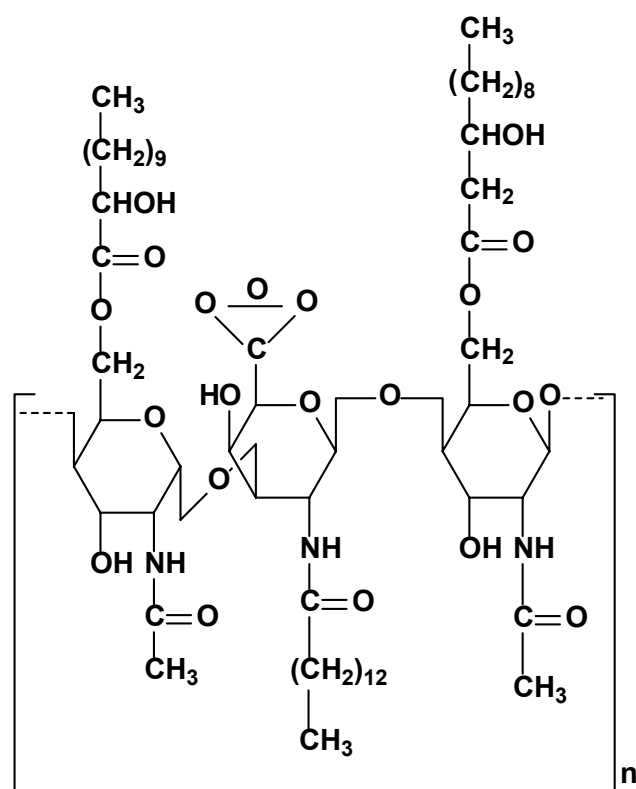
afundar, ocasionou um derramamento de 33.000 toneladas de óleo cru, contaminando várias praias e superfícies marinhas (MULLIGAN *et al.*, 2001).

Os biossurfactantes podem ser também divididos em categorias de baixo ou alto peso molecular. Os de baixo peso molecular são geralmente glicolipídios, soforolipídios, trealolipídios, ácidos graxos e fosfolipídios, enquanto os de alto peso molecular são polímeros compostos de polissacarídios, proteínas, lipopolissacarídios, lipoproteínas ou misturas complexas desses polímeros (ROSENBERG e RON, 2001) (Figura 1).

Os biossurfactantes são biodegradáveis e têm propriedades anfipáticas derivadas de sua estrutura complexa, que é composta de uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A parte hidrofóbica normalmente é uma cadeia de hidrocarboneto de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à porção hidrofílica. Essa porção pode ser aniônica ou catiônica, não-iônica ou anfotérica, constituída de um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxílico ou carboidrato (BOGNOLO, 1998). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (água/óleo) (DESAI *et al.*, 1997).



Trealolípido de
Rhodococcus
erythropolis



Surfactante Polimérico
(Emulsan) de *Acinetobacter*
calcoaceticus

Figura 1. (Cont.) Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.

2.2. Propriedades Físico-Químicas dos Biossurfactantes

Apesar da diversidade de composição química algumas características físico-químicas são comuns à maioria dos biossurfactantes. Essas características conferem vantagens sobre os surfactantes sintéticos e determinam as possíveis aplicações dos biossurfactantes. Eles são mais eficientes que os surfactantes sintéticos, por promoverem uma redução maior da tensão interfacial em menores concentrações (COOPER *et al.*, 1980). Apresentam ainda maior estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. No que se refere a essas características, um biossurfactante eficaz pode reduzir a tensão interfacial de soluções aquosas à faixa de 40 a 25 mN m⁻¹ (COOPER *et al.*, 1980). A surfactina, por exemplo, biossurfactante lipopetídico cíclico produzido por várias linhagens de *Bacillus subtilis*, pode reduzir a tensão interfacial da solução aquosa para até 27 mN m⁻¹ e é relatada como um dos biossurfactantes mais ativos (ARIMA *et al.*, 1968; WEI e CHU, 1998). Ramnolipídios de *P. aeruginosa* reduzem a tensão interfacial para uma faixa de 30 a 25 mN m⁻¹, podendo atuar como emulsificantes de alcanos e estimular o crescimento de *P. aeruginosa* em hexadecano (DEZIEL *et al.*, 1999). A redução da tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa é avaliada comumente utilizando-se um tensiômetro, pelo método do anel de du Nouy (PASSERI *et al.*, 1992, BODOUR e MILLER-MAIER, 1998, KUYUKINA *et al.*, 2001, MULLIGAN *et al.*, 2001). Esse método permite avaliar a diminuição do diâmetro médio das gotas de óleo que propicia o aumento da área interfacial. A concentração de biossurfactante no meio de cultura é expressa em termos de diluição micelar crítica (DMC), fator pelo qual a concentração efetiva excede a concentração micelar crítica (CMC), que equivale à concentração mínima na quais as micelas se formam (CASSIDY e HUDAK, 2001). A DMC pode ser estimada pela relação entre a tensão interfacial e as diluições do meio de cultura.

Os biossurfactantes apresentam a capacidade de formar emulsões estáveis, mantendo a dispersão de um líquido em outro. Essa propriedade é de fundamental importância nos processos de biorremediação, por garantir a emulsificação das moléculas hidrofóbicas no meio aquoso, tornando-as mais susceptíveis ao ataque microbiano e aos processos de evaporação ou

oxidação (KARANTH *et al.*, 1999). Além disso, a remoção do óleo contido nas borras oleosas fundamentalmente dependentes dessa propriedade (BANAT *et al.*, 1991).

2.3. Caracterização e Quantificação dos Biossurfactantes

A detecção de microrganismos produtores de biossurfactantes pode ser realizada pela técnica qualitativa do colapso da gota, em que uma gota de uma suspensão celular é adicionada a uma superfície untada com óleo. O resultado é considerado positivo quando o diâmetro da gota for maior do que o de uma gota de água deionizada (controle negativo) (JAIN *et al.*, 1991, BODOUR e MILLER-MAIER, 1998). Outro método comumente empregado é o do anel de du Nouy, que fornece a medida da tensão superficial e interfacial em um tensiômetro (PASSERI *et al.*, 1992, BODOUR e MILLER-MAIER, 1998, KUYUKINA *et al.*, 2001, MULLIGAN *et al.*, 2001).

A caracterização e a quantificação de biossurfactantes podem ser feitas ainda por cromatografia de camada fina analítica (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo essa última uma alternativa efetiva para a análise de biossurfactantes, em razão de sua maior sensibilidade e seletividade quando comparada às medidas de tensão e análise por TLC (LIN *et al.*, 1998). A análise por CLAE requer amostras de biossurfactantes relativamente puras, somente obtidas após operações trabalhosas de purificação. Os biossurfactantes extracelulares podem ser concentrados efetivamente por ultrafiltração com uso de membranas que retêm as micelas de biossurfactantes. A separação de vários tipos de biossurfactantes, produzidos por uma mesma espécie microbiana, é possível com o uso de cromatografia líquida - espectrometria de massa (LC/MS) (DÉZIEL *et al.*, 1999). A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) pode ser usada para a quantificação dos biossurfactantes, pois a maioria possui um radical carbonila, ligação éster ou ácido carboxílico, os quais absorvem energia na região infravermelha do espectro eletromagnético (GARTSHORE e COOPER, 2000). É usada também a espectrometria de ressonância magnética

nuclear (RMN) para a elucidação estrutural dos biossurfactantes (GARTSHORE e COOPER, 2000).

2.4. Síntese de Biossurfactantes

Os biossurfactantes são sintetizados por duas vias metabólicas, a dos hidrocarbonetos e a dos carboidratos, que estão envolvidas na síntese de seus grupos hidrofóbico e hidrofílico (DESAI *et al.*, 1997). O tipo de meio de cultura e as condições de crescimento do microrganismo podem influenciar na quantidade de biossurfactante produzido (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998, LANG, 2002). A fonte de carbono influencia diretamente a síntese por indução ou repressão (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Em alguns casos, a adição de substratos imiscíveis induz a produção de biossurfactantes, a exemplo da síntese do soforolipídio por *Torulopsis magnoliae*, que é induzida pela adição de ácidos graxos, hidrocarbonetos ou glicerídios ao meio de cultura (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). A síntese de trealolipídio por *R. erythropolis* é induzida pela adição de hidrocarbonetos, e a dos glicolipídios de *P. aeruginosa* pela adição de alcanos (LANG, 2002). A repressão da produção de biossurfactantes por várias espécies de bactérias foi observada na presença de ácidos orgânicos, de D-glicose, de acetato e de ácido tricarbóxico em muitas espécies de bactérias (LANG, 2002).

A utilização dos biossurfactantes em larga escala é ainda limitada pelo seu elevado custo, derivado dos processos atuais de produção (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998). O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo. Uma possível alternativa seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

2.5. Fatores que Afetam a Produção de Biossurfactantes

O tipo, a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por um microrganismo são influenciados por fatores tais como: (i) a natureza da fonte de carbono (GEORGIU *et al.*, 1992); (ii) as concentrações de nutrientes como N, P, Mg, Fe, S e Mn no meio (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991; ATLAS, 1981; COOPER *et al.*, 1981a; COOPER *et al.*, 1981b; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986; HAFERBURG *et al.*, 1986) e (iii) as condições de crescimento tais como pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível.

Embora os vários biossurfactantes possuam estruturas diferentes, há alguns aspectos comuns no que se refere à sua biossíntese. Geralmente, a produção de biossurfactantes é induzida por hidrocarbonetos ou por outros substratos insolúveis (KARANTH *et al.*, 1999). Outro aspecto notável é a repressão catabólica da síntese de biossurfactantes por glicose ou outros metabólitos primários. A adição de hexadecano a uma cultura de *Corynebacterium lepus* crescida em glicose promove a liberação de biossurfactantes das células (DUVNJAK *et al.*, 1982). Outros pesquisadores (BANAT *et al.*, 1991) observaram uma baixa produção de biossurfactantes quando as células foram crescidas em meio com fonte de carbono prontamente disponível. A adição de um hidrocarboneto imiscível após o consumo da fonte de carbono solúvel promove um aumento brusco na produção de biossurfactantes. Além da fonte de carbono, outros constituintes do meio também afetam a produção de biossurfactantes. O nitrogênio pode ser peça chave na regulação da síntese de biossurfactantes (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Entre os compostos de nitrogênio, os sais de amônio e a uréia foram os preferidos para produção de biossurfactantes por *A. paraffineus* (DUVNJAK *et al.*, 1982), enquanto o nitrato favoreceu a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; MACELWEE *et al.*, 1990; ROBERT *et al.*, 1989) e por *Rhodococcus* sp. (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991). Por outro lado, a limitação de nitrogênio causou um aumento na produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* (RAMANA *et al.*, 1989; SUZUKI *et al.*, 1974) e *Nocardia* SFC-D (KOSARIC *et al.*, 1990). A limitação de nitrogênio não somente causa a superprodução de biossurfactantes, mas também muda a

composição dos biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* sp. (SYLDATK *et al.*, 1985). Em *P. aeruginosa* RC-II, uma correlação positiva entre a síntese de ramnolipídios e a atividade de glutamina sintetase foi observada em condições limitadas de nitrogênio (MULLIGAN e GIBBS, 1989).

Fatores ambientais e condições de crescimento também afetam a produção de biossurfactantes através de seu efeito no crescimento ou na atividade celular. O valor de pH do meio é de grande importância na produção de soforolipídios por *T. bombicola* (GOBBERT *et al.*, 1984). A produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* sp. aumenta quando em meio com um pH na faixa de 6,0 a 6,5, diminuindo acentuadamente quando o pH excede a 7,0 (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984).

2.6. Aplicação de Biossurfactantes na Indústria do Petróleo

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (BANAT, 1995). Outras aplicações incluem os processos de biorremediação e a dispersão no derramamento de óleos, a remoção e mobilização de resíduos de óleo de tanques de armazenamento e a recuperação melhorada de petróleo.

2.6.1. Biorremediação

Grande parte das reservas de petróleo encontra-se no mar e os processos de transporte, estocagem e refino são os responsáveis pela introdução de quantidades consideráveis desse composto no ambiente. Os derramamentos acidentais de petróleo geralmente causam grandes impactos ambientais, o que exige a remoção imediata do contaminante. Diversas estratégias para remediação de áreas afetadas por petróleo são atualmente disponíveis. Entretanto, as estratégias convencionais apresentam problemas operacionais em razão do seu alto custo e da necessidade de pessoal e equipamentos especializados. Diante disso, os processos de biorremediação

tornam-se uma estratégia alternativa às tecnologias convencionais para remediação de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados, com um menor custo operacional e mínimos efeitos adversos ao ambiente (HEAD, 1998; OLLIS, 1992).

O uso de surfactantes produzidos por microrganismos vem apresentando-se como uma ferramenta adicional para a remediação de áreas contaminadas com petróleo (CHA, 2000). Diversas espécies de bactérias liberam biossurfactantes na presença de hidrocarbonetos hidrofóbicos, promovendo o aumento da solubilidade desses compostos no meio (BICCA *et al.*, 1999; BANAT, 1995). Parece plausível admitir que esses microrganismos, em ambientes com limitação de substratos orgânicos, possam usar esse mecanismo como uma estratégia de sobrevivência.

Os biossurfactantes têm sido usados em processos de degradação de hidrocarbonetos. Assim, no trabalho de LINDLEY e HEYDEMAN (1986), o fungo *Cladosporium resinae* cresceu em misturas de alcanos, produzindo ácidos graxos e fosfolipídios extracelulares, principalmente o ácido dodecanóico e a fosfatidilcolina (KARANTH *et al.*, 1999). O meio de crescimento suplementado com fosfatidilcolina aumenta a taxa de degradação do alcano em até 30%. Contaminantes presentes em solos podem ser recuperados ou subseqüentemente degradados em biorreatores após terem sido emulsificados no meio aquoso, como demonstram os estudos sobre lavagem *in situ* em biorreatores utilizando-se dois surfactantes sintéticos (ELLIS *et al.*, 1985) e os estudos de remoção de bifenis policlorados (PCBs) e de hidrocarbonetos do petróleo por biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* sp. (EHRlich *et al.*, 1985).

Os microrganismos produtores de surfactantes também podem ser usados para aumentar a solubilização de outros grupos de compostos orgânicos tóxicos, como os defensivos agrícolas (EHRlich *et al.*, 1985). A degradação de hexaclorociclohexano por *P. aeruginosa* foi relatada, sendo que outros organoclorados como DDT e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (KARANTH *et al.*, 1999). O surfactante de *P. aeruginosa* UG2 aumenta a solubilização de hexaclorobifenila aderida ao solo e resulta na recuperação de até 31% do composto na fase aquosa (BERG, 1988 citado por KARANTH *et al.*, 1999). Essa recuperação foi três vezes superior à obtida com

o surfactante químico lignossulfonato de sódio. O uso de biossurfactantes para a biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo, também tem sido estudado (MULLIGAN *et al.*, 2001). Surfactina de *B. subtilis* e ramnolipídio de *P. aeruginosa* solubilizaram o cobre ligado organicamente ao sedimento, enquanto sofrólipídio de *T. bombicola* foi capaz de solubilizar o zinco ligado aos componentes inorgânicos. Esses metais solubilizados podem ser removidos por processos de lavagem (MULLIGAN *et al.*, 2001).

A contaminação de ambientes marinhos por óleo é um problema que vem sendo solucionado com o uso de dispersantes químicos ou por remoção física do óleo das praias e da superfície do mar (IQBAL *et al.*, 1995). Quando o óleo se espalha no ambiente aquático, os hidrocarbonetos de baixo peso molecular são volatilizados e os componentes polares são espalhados na água. Em razão da baixa solubilidade do óleo (<1ppm), a degradação não é completa e os compostos de alto peso molecular, como as frações asfáltica, permanecem recalcitrantes (KARANTH *et al.*, 1999). Os mecanismos primários de remoção dos hidrocarbonetos são a fotooxidação, a evaporação e a degradação microbiana (BOGNOLO, 1998). As frações pesadas que permaneceram no ambiente, mesmo depois de sofrerem a ação dos processos físico-químicos, podem ser utilizadas pelos microrganismos.

2.6.2. Limpeza de Reservatórios de Óleos

Aproximadamente 1% do óleo total processado na Refinaria de Duque de Caxias (RJ) é descarregado como borra oleosa, normalmente após ter sido acumulado em tanques de armazenamento. A remoção das borras oleosas requer lavagens com solventes ou limpeza manual, ambas as operações perigosas, demoradas e caras (SORIANO e PEREIRA, 1998). A incineração desse resíduo não é recomendável, dado o alto custo da energia envolvida, o alto risco de poluição do ar e a persistência dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). SORIANO E PEREIRA (1998) realizaram o tratamento de borra oleosa através da estimulação de microrganismos nativos em um biorreator. O biotratamento foi atingido após 21 dias, resultando em um

percentual significativo de biodegradação pelos microrganismos nativos (89% de óleo e graxas; 99% de parafinas; 83% de aromáticos). Alternativamente, BANAT *et al.* (1991) demonstraram que borra oleosa de tanques de armazenamento de petróleo pode ser limpa, utilizando-se meio de cultura contendo biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa*, em substituição aos surfactantes convencionais. Aproximadamente 91% (774 m³) de hidrocarbonetos presentes no resíduo foram recuperados. O óleo recuperado pôde ser reaproveitado integralmente para refino e o valor desse óleo recuperado cobriu o custo da operação de limpeza (US\$ 100.000–150.000 por tanque). Os sólidos resultantes continham um baixo teor de óleo residual, tornando o descarte desses resíduos ambientalmente seguros (BANAT, 1991).

2.6.3. Recuperação Melhorada de Petróleo (MEOR)

A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que ajudam na recuperação do óleo, em razão da redução da tensão na interface óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (BANAT, 1995).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subsequente crescimento *in situ*; a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos nativos produtores de surfactantes ou, ainda, a produção de biossurfactantes em reatores e, posterior injeção no reservatório (BANAT, 1995). A última estratégia é mais cara, dada a necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfactante (DESAI *et al.*, 1997). As outras requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de biossurfactantes (BANAT, 1995). Para serem úteis para MEOR *in situ*, os microrganismos devem apresentar capacidade de crescimento sob as

condições extremas encontradas em reservatórios de óleos, tais como altas temperaturas, pressão, salinidade e baixos teores de oxigênio (GHURYE e VIPULANANDAN, 1994; MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; BOGNOLO, 1998).

Estudos de simulação estimaram que mais de 27 % dos reservatórios de óleos dos EUA apresentam-se capazes de sustentar o crescimento microbiano e MEOR (CLARK *et al.*, 1981, citados por KARANTH *et al.*, 1999). A eficácia da MEOR já foi relatada em estudos de campo nos EUA, na República Tcheca, na Romênia, na Rússia, na Hungria, na Polônia e na Holanda, sendo significativo o aumento na recuperação de óleo em alguns casos (KARANTH *et al.*, 1999).

Os biossurfactantes podem ser utilizados para reduzir a viscosidade de óleos pesados, facilitando a recuperação do óleo em jazidas e o transporte em oleodutos (BOGNOLO, 1998). Os emulsificantes com alto peso molecular, como o lipopolissacarídeo produzido por *Acinetobacter calcaoceticus* RAG-1, podem ter inúmeras aplicações na indústria do petróleo, a exemplo da limpeza de óleo de barcas e tanques, da redução da viscosidade de óleos pesados e aumento da recuperação de óleos de reservatórios naturais (CHA, 2000).

Neste trabalho, procurou-se otimizar as condições para a produção de biossurfactantes por culturas bacterianas pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) Departamento de Microbiologia (DMB) - Universidade Federal de Viçosa (UFV). Adicionalmente, foi avaliado o potencial dos biossurfactantes produzidos em remover o óleo retido em borra oleosa de tanques de armazenamento de óleo combustível.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta da Borra Oleosa

A amostra de borra oleosa foi originada de tanques de armazenamento de óleo combustível da Refinaria de Capuava, Mauá, SP, pertencentes à Petrobras (Petróleo Brasileiro S/A).

3.2. Caracterização da Borra Oleosa

A caracterização foi realizada nas fases bruta e orgânica pelo Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A fase orgânica foi extraída com cloreto de metileno em temperatura ambiente por 24 horas. Após a extração, o solvente foi evaporado utilizando um rotavapor a 45°C. Os teores de nitrogênio, de ferro e de fósforo foram determinados na fase aquosa por quimiluminescência (Antek 700) (ASTM E258). A concentração de água foi avaliada na fase orgânica e na borra bruta pelo método de Karl Fisher (ASTM-D1364-95). Foram medidos adicionalmente no resíduo bruto a densidade (ASTM D1298-85), a viscosidade (ASTM D445-94) e o pH (LOUVISSE, 1994).

3.3. Isolamento de Microrganismos

A amostra de borra oleosa foi diluída em solução salina estéril e plaqueada em meio GP2 (CHANG *et. al.* 2000) (Quadro 1) suplementado com glicose (2% p/v), gasolina (2% v/v) ou petróleo (2% v/v). As colônias morfológicamente distintas foram repicadas e purificadas por plaqueamento, pelo menos três vezes, para se obter culturas puras, as quais foram mantidas em solução de glicerol a -80°C.

Os isolados obtidos da amostra de borra oleosa, além dos isolados ES20A, 47, 58, 73, 88A, 88B, 99, 105A, 105B, 105C, 111A, 111B, 118, 134 e 155, obtidos de amostras de solo e água coletadas em áreas com histórico de contaminação com petróleo ou seus derivados (Quadro 2), já incluídos na coleção do Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (BBMA) e previamente selecionados como produtores de biossurfactantes por BATISTA (2000), foram utilizados neste trabalho.

Quadro 1. Composição dos meios R2A, GP2 e MM

Meio R2A ¹		Meio GP2 ²		MM ³	
Componente	g L ⁻¹	Componente	g L ⁻¹	Componente	g L ⁻¹
Extrato de levedura	0,5	NaCl	21,03	Na ₂ HPO ₄	2,7
Peptona proteose	0,5	Na ₂ SO ₄	3,52	KH ₂ PO ₄	1,4
Casaminoácidos	0,5	KCl	0,61	NaNO ₃	0,5
Glicose	0,5	KBr	0,088	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,154
Amido solúvel	0,5	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,03	K ₂ SO ₄	0,36
Piruvato de sódio	0,3	MgCl ₂ .H ₂ O	9,50	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	0,3	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,32	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,027
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05	SrCl ₂ .6H ₂ O	0,02	NaCl	0,1
		Na ₅ P ₃ O ₁₀	0,297	Extrato de Levedura	0,01
		NaHCO ₃	0,17		
		KNO ₃	2,89	Solução de	
		FeCl ₃ .6H ₂ O	0,05	Micronutrientes:	
				MnSO ₄ .4H ₂ O	0,02
				ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,525
				CuSO ₄ .7H ₂ O	0,705
				CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
				H ₃ BO ₃	0,02
				Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,015
pH	7,0		8,0		6,8

¹ REASONER e GELDREICH (1985).

² CHANG *et al.* (2000).

³ BANAT *et al.* (1991).

Quadro 2. Origem dos microrganismos utilizados na seleção de produtores de biossurfactantes, além dos isolados neste trabalho

ISOLADO	ORIGEM
ES20A	Landfarming REGAP ¹
47	Solo Landfarming C.E. ² gasolina A
58	Solo Landfarming C.E. gasolina A
73	Lodo C.E. petróleo
88A e 88B	Lodo C.E. gasolina A
99	Solo oficina mecânica UFV
105A, 105B e 105C	Solo oficina mecânica UFV
111A e 111B	REDUC ³ sedimento mangue
118	REDUC sedimento fundo mangue
134	REDUC sedimento superficial mangue
155	REDUC sedimento mangue

¹REGAP = Refinaria Gabriel Passos, Betim, MG.

²C.E. = Cultura de enriquecimento.

³REDUC= Refinaria Duque de Caxias, Rio de Janeiro, RJ.

3.4. Triagem dos Isolados Produtores de Biossurfactantes

Foi realizada uma triagem inicial dos isolados quanto à produção de biossurfactantes por meio da técnica qualitativa do colapso da gota (BODOUR e MILLER-MAIER, 1998) modificada por BATISTA (2002). Os isolados foram crescidos em meio R2A (Quadro 1) e incubados em meio mineral (BANAT *et al.* 1991) (Quadro 1) suplementado com glicose 2% (p/v) e hexadecano 2% (v/v) (adicionado após esgotamento da glicose, acompanhado com o reagente GOD PAP), sob temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm, por sete dias. A produção de biossurfactantes foi avaliada diariamente tanto no sobrenadante, obtido após centrifugação a 12.000 g por 15 minutos, quanto na suspensão celular. O espalhamento da gota foi avaliado um minuto após a aplicação da amostra e o resultado foi considerado positivo quando o diâmetro da gota foi maior do que o de uma gota de água desionizada (controle negativo). Como controle positivo foi utilizado uma solução do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% (p/v). Os isolados com resultado positivo quanto à produção de biossurfactantes foram avaliados quanto à capacidade de reduzir a tensão interfacial no sobrenadante pelo método do anel de du Nouy,

utilizando-se um tensiômetro (Fisher Surface Tensiomat, Modelo 21, Pittsburgh, EUA).

3.5. Determinação da Temperatura Ótima de Crescimento dos Isolados Produtores de Biossurfactantes

Culturas-estoque de cinco dos isolados produtores de biossurfactantes foram reativadas em ágar R2A (Quadro 1) por 24 horas e transferidas para meio mineral (Quadro 1) (BANAT *et al.* 1991) acrescido de glicose (2 % p/v). Erlenmeyers de 200 mL, contendo 100 mL de MM (Quadro 1), foram inoculados com um volume dos inóculos, visando obter uma densidade ótica inicial a 600 nm correspondente a 0,02. As culturas foram incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C e 50°C sob agitação de 200 rpm. O crescimento microbiano foi acompanhado por meio da medida da densidade ótica a 600 nm, a cada 1 hora, até 24 h após a inoculação.

3.6. Identificação dos Isolados Produtores de Biossurfactantes

A identificação dos isolados que apresentaram resultado positivo para a produção de biossurfactantes foi feita pela análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Para isso, os isolados foram crescidos a 28°C em placas de ágar tripticase de soja (TSA) durante 24 h. Os ácidos graxos foram saponificados, metilados, extraídos e analisados por cromatografia gasosa utilizando-se o sistema Sherlock da Microbial Identification System (MIDI, Newark, DE, EUA). A identificação foi realizada pela comparação do perfil de ácidos graxos com uma biblioteca de referência armazenada em banco de dados para microrganismos aeróbicos de amostras ambientais do sistema (TSBA, versão 4.0).

3.7. Testes Para Otimização da Produção de Biossurfactantes

Foi realizado um experimento em esquema fatorial (5 X 3 X 6) no delineamento em blocos casualizados com duas repetições, correspondente a cinco isolados microbianos, a três fontes de carbono (borra oleosa, dodecano e hexadecano) e a seis formulações de meios de cultura, onde foram avaliados os efeitos da concentração dos elementos nitrogênio, ferro e fósforo.

Os isolados foram reativados em meio R2A por 18 horas. Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio mineral (BANAT *et al.* 1991) modificado (Quadro 3) foram inoculados com um volume de inóculo suficiente para se obter uma densidade ótica a 600 nm correspondente a 0,02. Os erlenmeyers foram incubados à temperatura ótima para cada isolado. O consumo da glicose disponível foi avaliado a cada 3 horas pelo reagente GOD-PAP. Após o esgotamento da glicose, foram adicionados os substratos hexadecano, dodecano ou borra oleosa a 2% (v/v). O crescimento celular foi avaliado pela leitura da DO_{600nm} a cada 24 horas.

Quadro 3. Composição dos meios modificados da composição original do MM (Quadro 1) para cultivo dos isolados durante a otimização da produção de biossurfactantes

COMPONENTE	MEIOS					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Na ₂ HPO ₄	2,7	2,7	2,7	2,7	-	-
KH ₂ PO ₄	-	1,4	1,4	1,4	0,5	-
K ₂ HPO ₄	1,4	-	-	-	1,0	2,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaNO ₃	0,5	-	-	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,154	0,154	0,154	0,154	0,154	0,154
K ₂ SO ₄	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,027	0,027	0,007	-	0,027	0,027
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	-	0,003	-	-
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Extrato de levedura	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Solução de micronutrientes	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
pH	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8

A concentração micelar crítica dos biossurfactantes (CMC) não-purificados nas culturas e nos sobrenadantes foi estimada pela medição da tensão interfacial pelo método do anel de du Nouy (COOPER *et al.*, 1979). As diluições dos meios de cultura e de seus sobrenadantes foram preparadas em água deionizada, sendo a tensão interfacial das diluições do sobrenadante quantificada em tensiômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). A CMC foi estimada após a elaboração de gráficos de tensão interfacial versus diluição do meio, como o recíproco da diluição micelar crítica, na qual a tensão interfacial começa a aumentar (COOPER *et al.*, 1979). Essa avaliação foi realizada com duas repetições para cada isolado, sendo que cada repetição foi avaliada em duplicata.

A avaliação da capacidade de emulsificação (DAS *et al.*, 1998) foi feita utilizando-se culturas crescidas sob as mesmas condições utilizadas no teste qualitativo do colapso da gota. As células foram retiradas por centrifugação (12.000 *g* por 5 min) e 2 mL do sobrenadante foram misturados a 2 mL de querosene em um tubo de ensaio (100 mm X 15 mm). A mistura foi agitada por dois minutos em tubo vedado com Parafilm (American National Can TM) e deixada em repouso por dois minutos, medindo-se a seguir o volume da emulsão formada (DAS *et al.*, 1998). A estabilidade foi avaliada em intervalos de tempo até 42 h após o início do ensaio. O volume da emulsão (VE (%)) formada foi calculado pela fórmula:

$$VE (\%) = \frac{\text{altura da emulsão (mm)} \times \text{área da secção transversal (mm)}^2 \times 100}{\text{Volume total (= 4000 mm}^3)}$$

A estabilidade da emulsão EE (%), após o tempo *t* foi quantificada pela fórmula:

$$EE (\%) = \frac{VE_t(\%)}{VE_0(\%)} \times 100$$

Sendo: $VE_t(\%)$ = Volume de emulsão medida no tempo *t*

$VE_0(\%)$ = Volume de emulsão medida no tempo zero

A emulsão foi considerada estável se seu volume, 24 horas após a sua formação, correspondia a 50% ou mais de seu volume original (WILLUMSEM e KARLSON, 1997).

As emulsões formadas foram comparadas às formadas por um surfactante sintético, dodecil sulfato de sódio (SDS), a uma concentração de 1 % (p/v) em água deionizada. Essa concentração de SDS foi escolhida por ser maior do que a sua concentração micelar crítica, estimada em 0,18% (BODOUR e MILLER-MAIER 1998). Essa avaliação foi realizada com duas repetições para cada isolado, sendo que cada repetição foi analisada em duplicata.

3.8. Tratamento da Borra Oleosa com Biossurfactantes

Borra oleosa esterilizada por calor úmido a 121°C durante 20 minutos, água de torneira e meio de cultura contendo biossurfactante foram adicionados a frascos estéreis na proporção de 44 mL de borra oleosa, 56 mL de água de torneira e 10µL de meio contendo biossurfactante, com duas repetições. A mistura foi agitada em agitador orbital a 200 rpm durante cinco dias até que toda a borra oleosa fosse ressuspensa do fundo do frasco (BANAT *et al.*, 1991). A agitação foi então interrompida e a emulsão foi desfeita pela adição de nitrato de magnésio. Após a separação das fases em funil de separação, a fase aquosa foi descartada e o óleo recuperado foi medido, determinando-se o percentual do óleo inicialmente contido na borra que pôde ser recuperado.

3.9. Análises Estatísticas

Para cada característica avaliada, foi realizada uma análise de variância, pelo teste de F, a 5% de probabilidade. Posteriormente, de acordo com o resultado de significância das interações, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparar os efeitos dos tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da Borra Oleosa

A borra oleosa proveniente da RECAP (SP) contém quantidades consideráveis de nitrogênio, ferro e fósforo (Quadro 4). A maior fração do nitrogênio está na forma orgânica, ao contrário do ferro e do fósforo. A disponibilidade de nutrientes inorgânicos, associada ao elevado teor de água na borra bruta e a abundância de substrato orgânico, tende a favorecer a atividade e a multiplicação microbiana. A viscosidade diminui substancialmente com o aumento da temperatura (Quadro 4). Para que um líquido escoe livremente, é necessário que sua viscosidade esteja abaixo de 100 cP. Portanto, o alto valor encontrado para a viscosidade da borra oleosa (899,3 cP em temperatura ambiente) não permite que ela escoe livremente, o que explica a dificuldade de remoção desse resíduo dos fundos dos tanques de armazenamento de óleo.

Quadro 4. Caracterização da borra oleosa

ANÁLISE	FASE BRUTA	FASE ORGÂNICA
N total (mg dm	180	130
Fe total (mg dm	500	ND
P total (mg dm	300	ND
Água (%)	24%	0,025%
pH	6,0	8,0
Densidade (g cm ⁻³)	0,923	0,897
Viscosidade (cP):		
30°C	899,3	ND
50°C	212,3	ND
70°C	68,9	ND

ND= não determinado

1cP (centipoise)= $10^{-3}\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$

4.2. Isolamento e Seleção dos Microrganismos Produtores de Biossurfactantes

Foram isolados da amostra de borra oleosa 21 culturas bacterianas que apresentaram características culturais distintas, como morfologia e pigmentação das colônias e coloração de gram. Os isolados foram cadastrados como 187 a 206 e incorporados à coleção do LBBMA do DMB/UFV.

Os isolados da amostra de borra oleosa, além dos outros 16 isolados já pertencentes à coleção do LBBMA (Quadro 2), foram avaliados pelo método qualitativo do colapso da gota, que permitiu a seleção de 15 isolados produtores de biossurfactantes (47, 58, 88A, 99, 111A, 111B, 105A, 134, 155, 187, 190, 191, 195, 200 e 201). Todos excretaram biossurfactantes para o meio de cultura, como verificado pelo método do colapso da gota, e a presença de biossurfactantes foi detectada tanto no meio contendo as células quanto no sobrenadante. Todos os isolados promoveram a redução da tensão interfacial do meio para valores abaixo de 40 mN m^{-1} .

O cultivo desses 15 isolados em meio mineral adicionado de borra oleosa, dodecano e hexadecano (2% v/v), demonstrou que 10 deles (88A, 99,

111A, 111B, 105A, 134, 155, 187, 191, e 201) produziram biossurfactantes após o esgotamento da glicose (2 % p/v). Limitou-se aos isolados 88A, 111A, 155, 191 e 201 a realização dos ensaios de otimização da produção de biossurfactantes, pois eles promoveram maior redução de tensão superficial no meio com as três fontes de carbono. Três dos isolados foram identificados como sendo *Pseudomonas aeruginosa* (88A), *Bacillus subtilis* (155) e *Arthrobacter* sp. (201). Os isolados 111A e 191, que é um actinomiceto, não foram reconhecidos pelo sistema MIDI.

As maiores taxas de crescimento foram obtidas a 30°C e a 40°C para todos os isolados (Figura 2). Optou-se, a partir desses resultados, por se conduzir os ensaios de otimização da produção de biossurfactantes a 30°C.

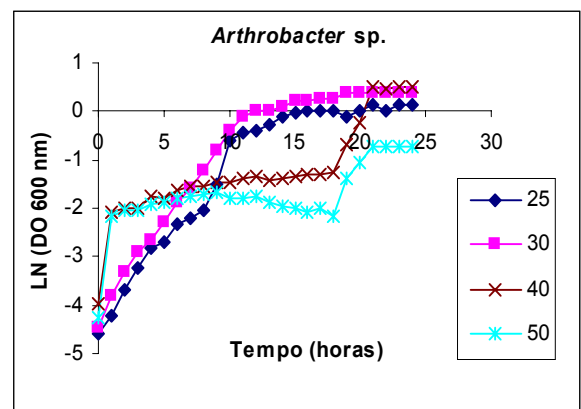
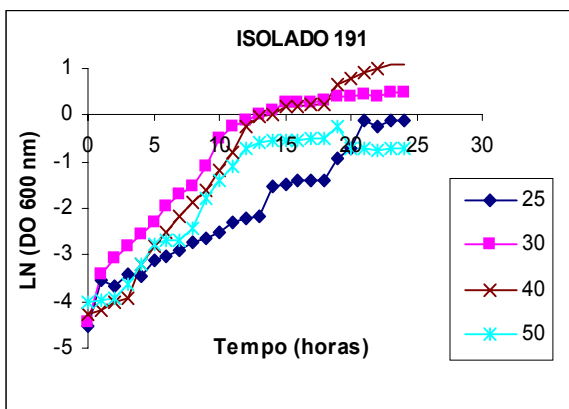
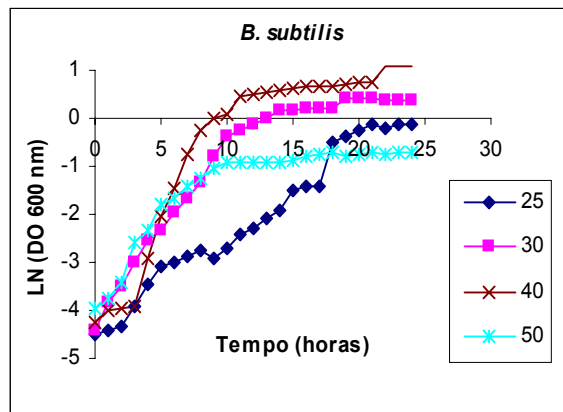
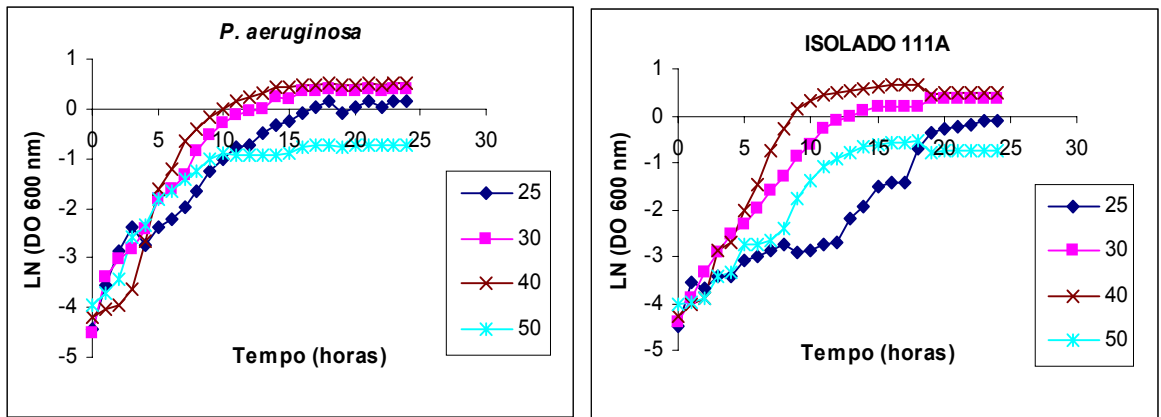


Figura 2. Curva de crescimento dos isolados bacterianos em diferentes temperaturas em MM (Quadro 1) suplementado com Hexadecano.

4.3. Tensão Interfacial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

Houve efeito significativo dos fatores estudados sobre a produção de biossurfactantes, avaliada pela redução da tensão interfacial nos meios de crescimento, para todos os cinco isolados bacterianos testados (Quadro 1A, Apêndice A). As interações entre os fatores foram desdobradas para se separar os efeitos dos tratamentos (Quadros 2A-4A, Apêndice A). As médias foram então comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Quadro 5).

O crescimento dos cinco isolados previamente selecionados em MM suplementado com borra oleosa, dodecano e hexadecano a 2% (v/v), adicionados após o esgotamento da glicose a 2% (p/v), reduziu significativamente as tensões interfaciais (Quadro 5 e Figuras 3a-f). Os valores ficaram abaixo do controle positivo, SDS a 1% (41 mN m^{-1}) (BATISTA, 2001), confirmando a presença de compostos com as propriedades tensoativas de biossurfactantes (redução da tensão interfacial do meio para valores abaixo de 40 mN m^{-1}) (COOPER *et al.*, 1979).

A resposta dos diferentes isolados às fontes de carbono avaliadas (borra oleosa, dodecano e hexadecano) foi variável de acordo com a composição mineral dos meios de cultura (Quadro 5). Para os isolados 111A, 155 e 201, os meios que propiciaram os menores valores de tensão interfacial foram os meios M2, M3 e M5, independentemente da fonte de carbono (Quadro 5). Não houve diferença significativa entre os meios M2, M3, M4, M5 e M6 para o isolado 191, exceto quando se utilizou dodecano ou hexadecano como fonte de carbono, condição em que o resultado com o meio M1 foi inferior aos obtidos com os meios M2, M3, M5 e M6. A produção de biossurfactantes por esse isolado também não foi alterada pela mudança na fonte de carbono, independentemente do meio utilizado (Quadro 5). Os melhores resultados para o isolado 88A foram obtidos nos meios M3 e M5, em todas as fontes de carbono.

Quadro 5. Médias dos valores de tensão interfacial nos sobrenadantes dos meios de cultura, inoculados com cinco isolados bacterianos, em resposta à variação na formulação do meio de cultura (Quadro 3) e à fonte de carbono à 2% (v/v), após o cultivo dos isolados por 7 dias, a 30°C e 200 rpm

ISOLADO/MEIO	FONTE DE CARBONO		
	BORRA OLEOSA	DODECANO	HEXADECANO
88A – M1	46,0 Ab	53,8 Aa	53,1 Aa
88A – M2	35,2 BCa	34,1 CDa	35,8 Ca
88A – M3	31,0 Da	31,1 Da	32,2 CDa
88A – M4	39,3 Ba	41,7 Ba	41,7 Ba
88A – M5	31,2 CDa	30,5 Da	29,8 Da
88A – M6	33,8 CDb	37,6 BCa	35,6 Cab
111A – M1	45,2 Ac	49,5 Abc	60,2 Aa
111A – M2	30,2 Ca	31,7 Ca	32,8 Da
111A – M3	31,8 Ca	35,9 Ca	32,4 Da
111A – M4	39,6 Bc	51,7 Abc	53,9 Ba
111A – M5	31,6 Ca	32,5 Ca	30,7 Da
111A – M6	38,2 Ba	41,9 Ba	39,3 Ca
155 – M1	59,0 Aa	54,9 Ab	51,5 Ab
155 – M2	37,0 Cb	39,8 Bab	41,3 Ba
155 – M3	30,1 Da	30,5 Ca	30,8 Ca
155 – M4	ND	ND	ND
155 – M5	30,6 Da	34,5 Ca	32,2 Ca
155 – M6	48,6 Bb	56,7 Aa	48,6 Ab
191 – M1	44,2 Bb	52,3 Aa	57,2 Aa
191 – M2	31,1 Ba	30,1 Ba	30,9 BCa
191 – M3	31,0 Ba	28,4 Ba	29,2 Ca
191 – M4	31,0 Ba	32,8 Ba	34,8 Ba
191 – M5	30,1 Ba	31,1 Ba	31,0 BCa
191 – M6	33,0 Ba	30,5 Ba	31,4 BCa
201 – M1	39,7 Bc	53,8 Aa	53,1 Aa
201 – M2	31,7 Ca	34,1 CDa	35,8 Ca
201 – M3	32,0 Ca	31,1 Da	32,2 CDa
201 – M4	34,0 Ca	41,7 Ba	41,7 Ba
201 – M5	34,3 Ca	30,5 Da	29,8 Da
201 – M6	45,6 Aa	37,6 BCb	35,6 Cb

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ND = Não determinado

A utilização do amônio (meio M2) em lugar do nitrato (meio M1) como fonte de nitrogênio favoreceu a produção de biossurfactantes para todos os isolados testados. Esse efeito foi observado tanto para a redução da tensão interfacial (Quadro 5) quanto para a estabilidade das emulsões com querosene (Figuras 4-6). Nas demais formulações (M3, M4, M5 e M6, Quadro 3), o nitrato foi a forma utilizada como fonte de nitrogênio. Ainda assim, os resultados obtidos nesses meios foram, vistos de regra, superiores aos do meio M1 (Quadro 5 e Figuras 3a-f). Essas diferenças foram, portanto, atribuídas às diferenças tanto das concentrações quanto das fontes de ferro (meios M3 e M4) ou de fósforo (meios M5 e M6), em relação às empregadas no meio M1. Esses resultados abrem, portanto, novas oportunidades para avanços ainda mais significativos na formulação dos meios de cultura visando maximizar a produção de biossurfactantes.

De modo geral, os meios que propiciaram a maior produção de biossurfactantes, estimada pela redução da tensão interfacial dos sobrenadantes das culturas microbianas, foram o M2, o M3 e o M5 (Quadro 5). A borra oleosa foi um indutor efetivo da produção de biossurfactantes. Os resultados obtidos com essa fonte de carbono foram iguais ou superiores aos obtidos com dodecano e hexadecano, exceto para o isolado 155 no meio M1 e para o isolado 201 no meio M6 (Quadro 5). Essa capacidade de indução da produção de biossurfactantes pode ser atribuída à própria constituição desse resíduo, composto basicamente pelas frações mais pesadas do petróleo, cuja presença parece estimular a excreção de biossurfactantes para facilitar sua solubilização (URURAHY *et al.*, 1998). Tem-se, com isso, uma fonte amplamente disponível e de reduzido custo para a produção em larga escala de biossurfactantes. A utilização de um meio de fermentação contendo biossurfactantes, esterilizado ou pasteurizado, sem necessitar passar por um processo de extração, concentração ou purificação do biossurfactante, pode reduzir significativamente o custo de sua utilização para o tratamento de borras oleosas.

A diluição micelar crítica (DMC), fator pelo qual a concentração efetiva excede a concentração micelar crítica (CMC) (CASSIDY e HUDAK, 2001), situou-se entre 0,01% e 1% (Figuras 3a-f). A partir dessa diluição, ocorre o rompimento das micelas de biossurfactantes. Desta forma, inferiu-se que as

concentrações dos biossurfactantes nos meios estão de 100 a 10.000 vezes acima de suas CMCs, resultados similares aos obtidos por BANAT *et al.* (1991).

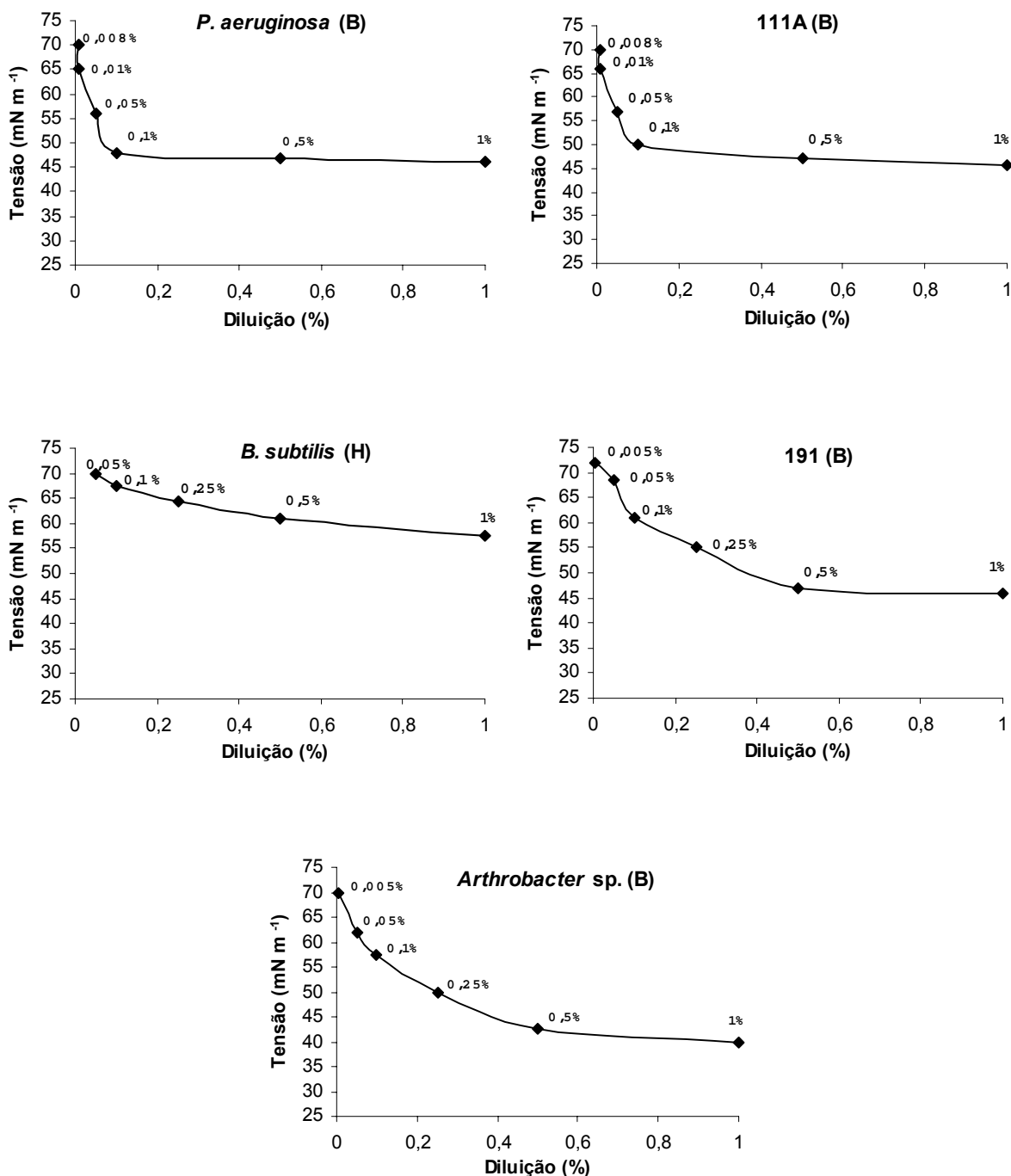


Figura 3a. Tensão interfacial do meio de cultura M1 suplementado com borra oleosa (B) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, a 30°C e 200 rpm.

- Nesta e nas demais figuras (3b-f) foi apresentado, para cada isolado, somente o resultado da avaliação da CMC nos sobrenadantes obtidos com a fonte de carbono que propiciou a maior redução da tensão interfacial. Os resultados para as demais fontes de carbono estão apresentados nas Figuras 1a-f (Anexo).

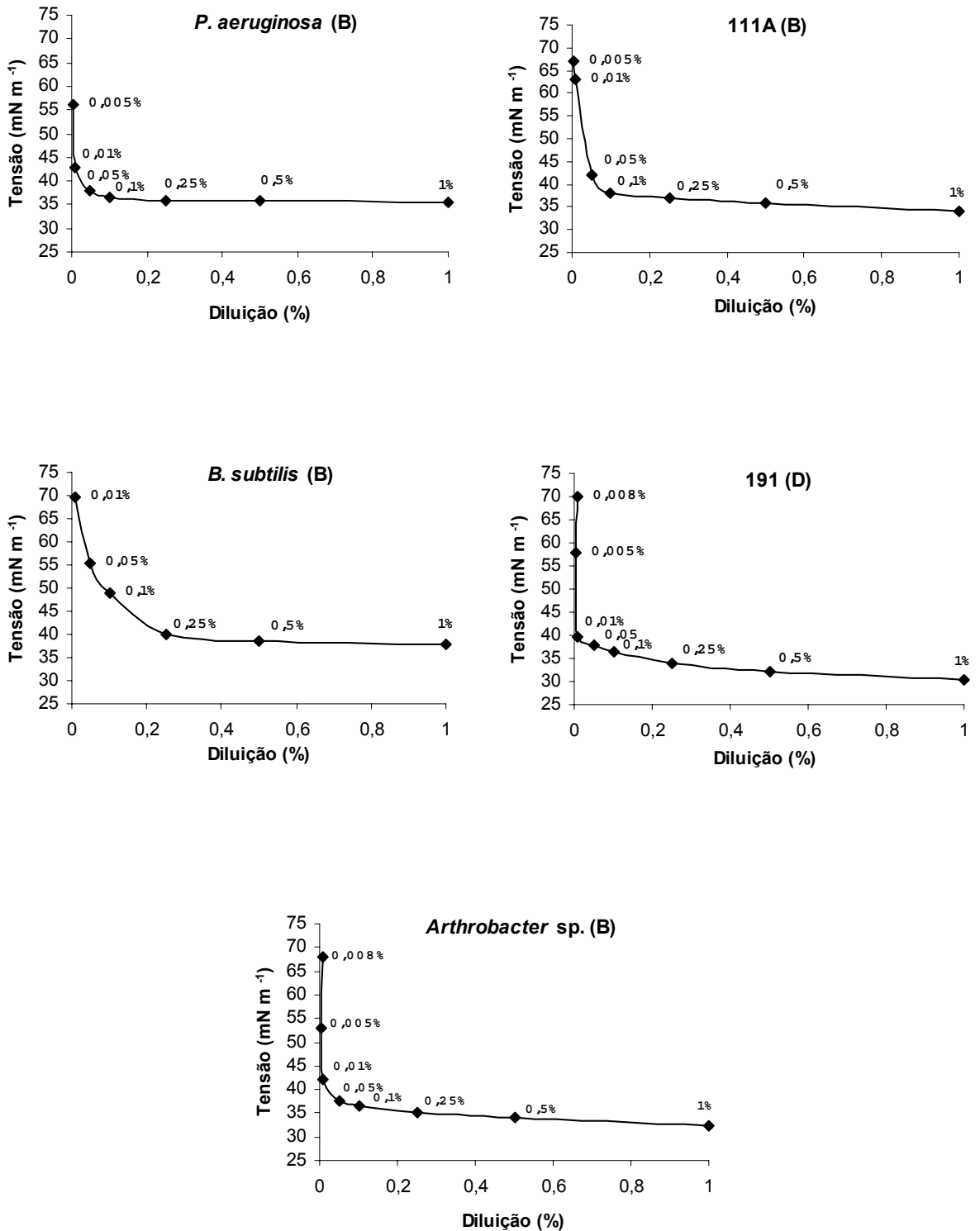


Figura 3b. Tensão interfacial do meio de cultura M2 suplementado com borra oleosa (B) ou dodecano (D) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, a 30°C e 200 rpm.

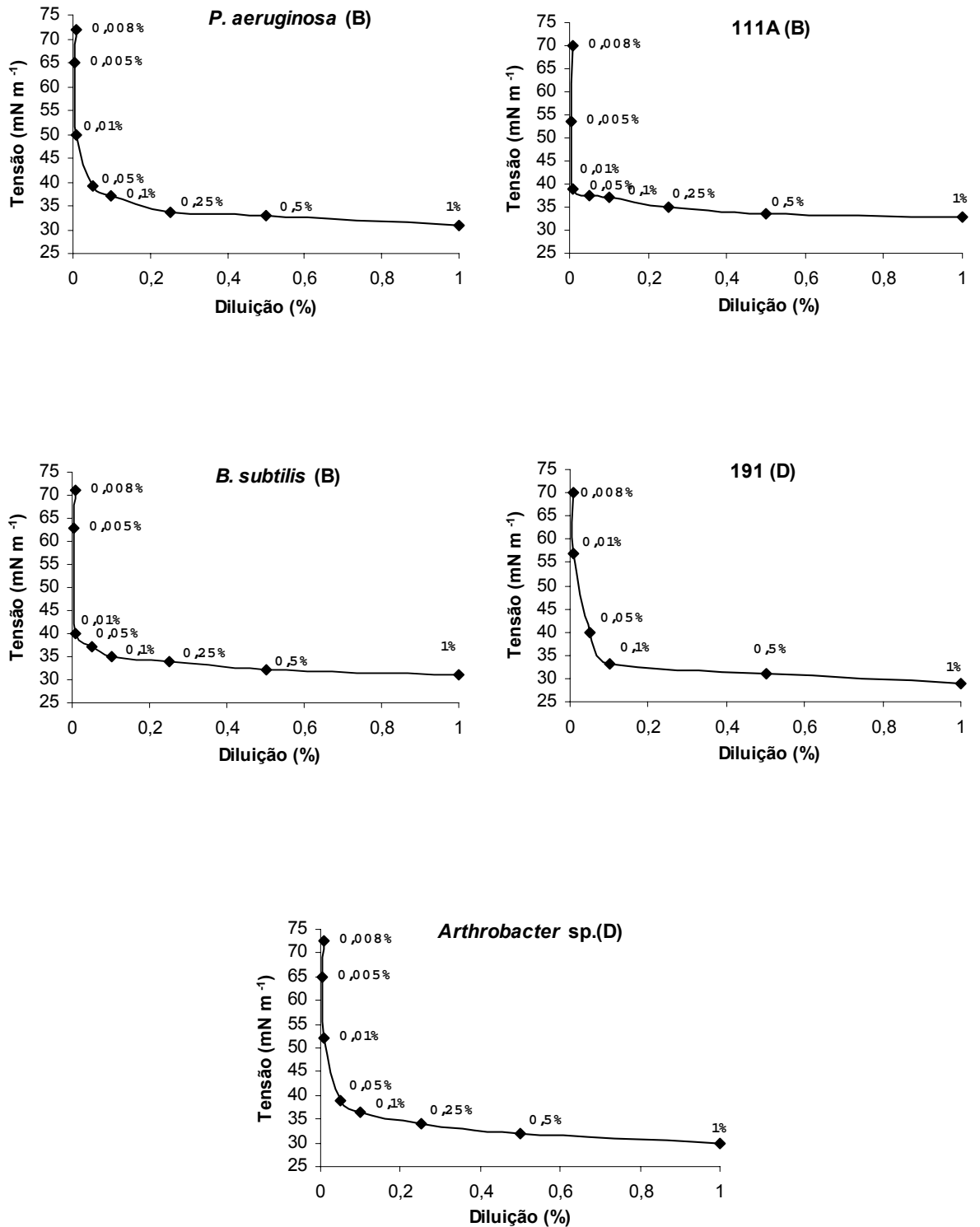


Figura 3c. Tensão interfacial do meio de cultura M3 suplementado com borra oleosa (B) ou dodecano (D) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

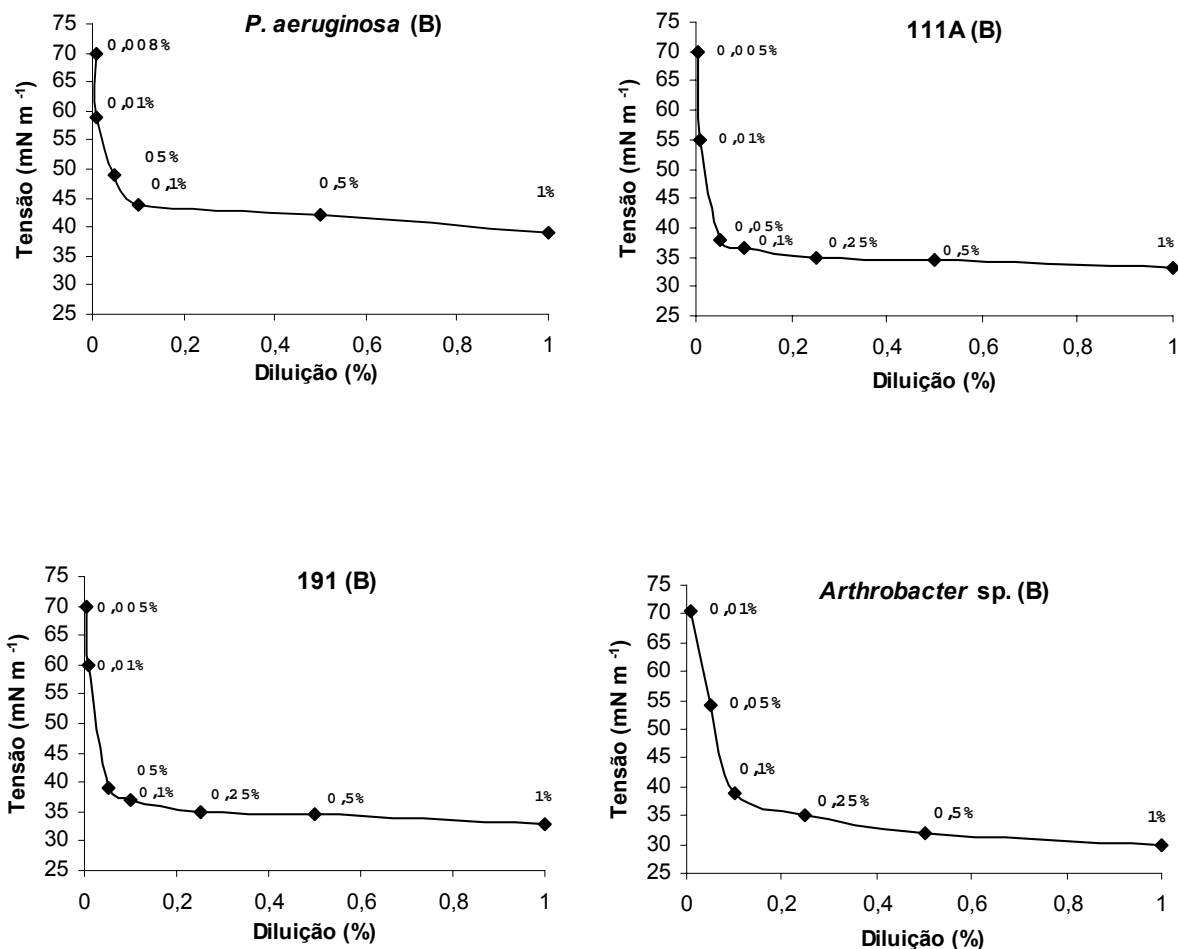


Figura 3d. Tensão interfacial do meio de cultura M4 suplementado com borra oleosa (B) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

- O isolado 155 não foi capaz de crescer nesse meio de cultura.

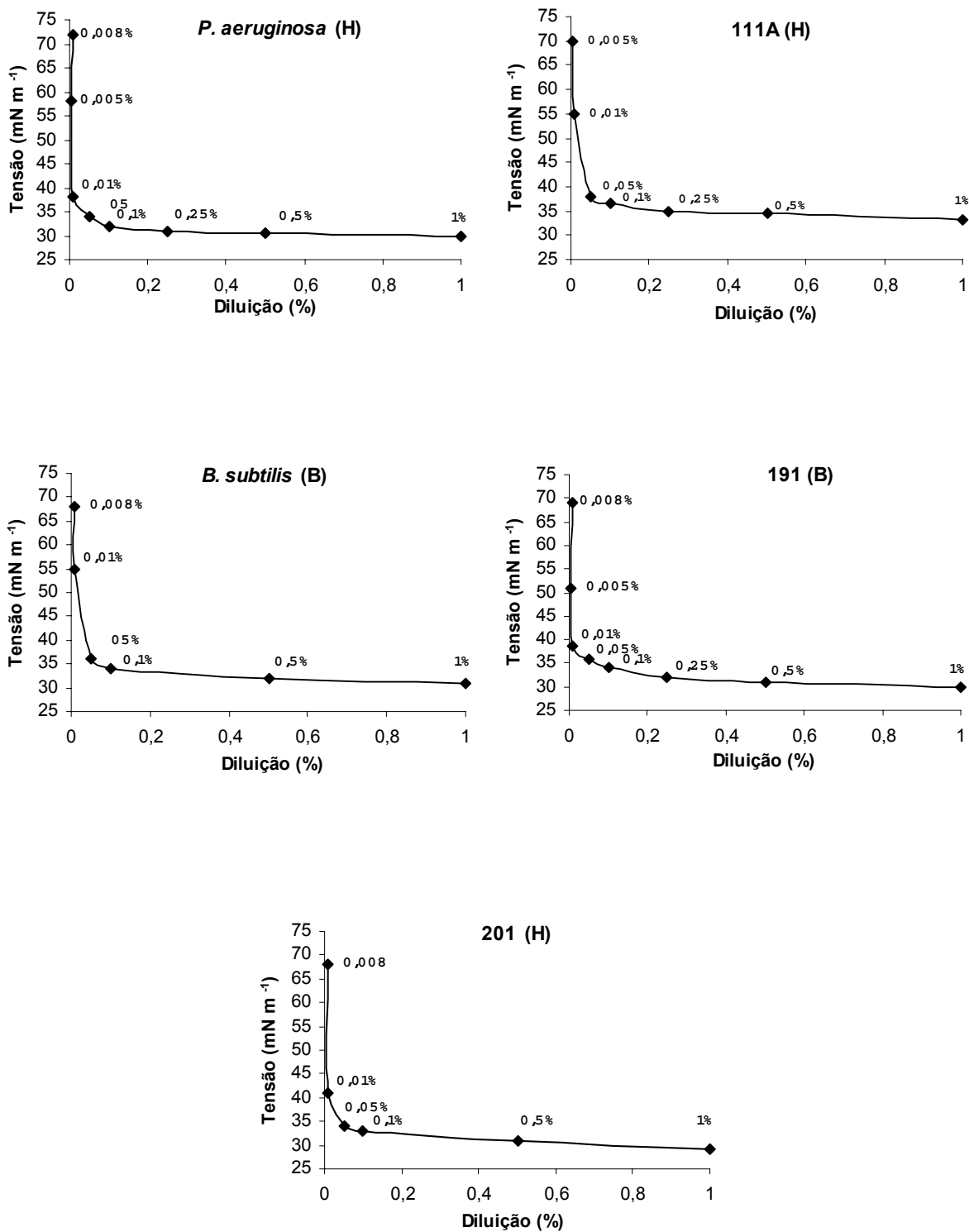


Figura 3e. Tensão interfacial do meio de cultura M5 suplementado com borra oleosa (B) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

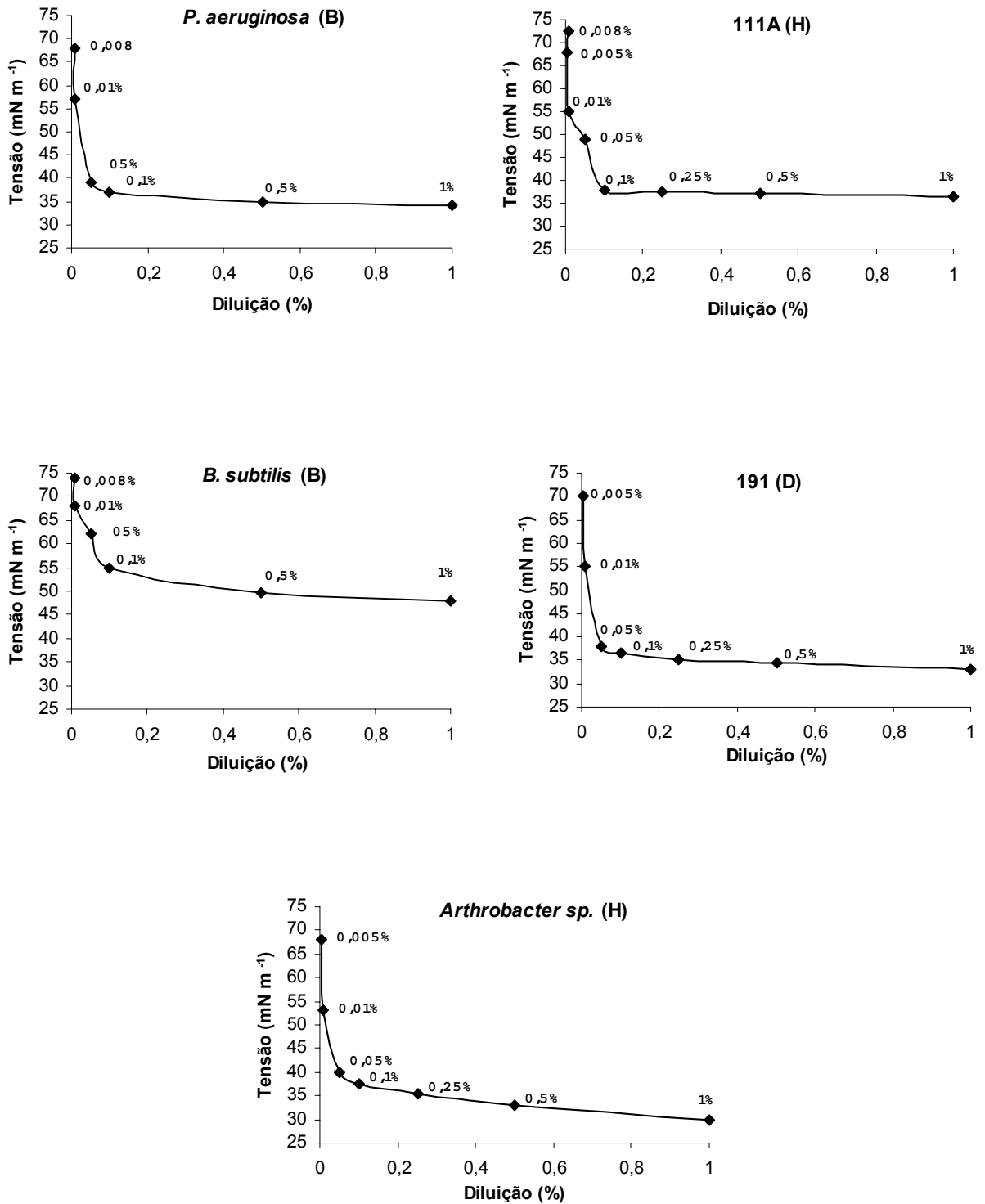


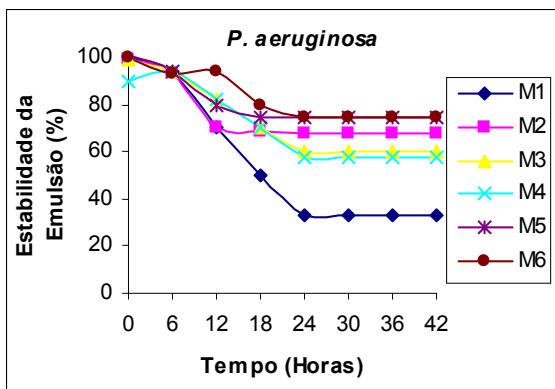
Figura 3f. Tensão interfacial do meio de cultura M6 suplementado com borra oleosa (B), dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

4.4. Formação e Estabilidade das Emulsões

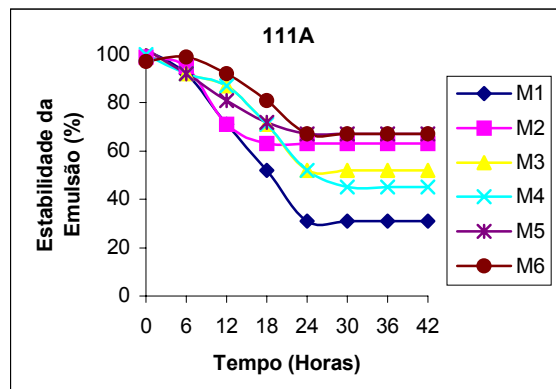
Os cinco isolados testados formaram emulsões estáveis com querosene (Figuras 4-6). Essa também é uma característica específica de moléculas que possuem caráter anfifílico (COOPER *et al.*, 1979; FIEBIG *et al.*, 1997). A resposta, porém, foi dependente do meio de cultivo. Apenas o isolado 191 apresentou capacidade de emulsificação no meio M1 (Figuras 4-6), confirmando mais uma vez o fraco desempenho desse meio, já observado em termos de redução da tensão interfacial (Quadro 5 e Figuras 3a-f).

Os isolados apresentaram alta capacidade para estabilizar as emulsões com querosene ao longo de 42 horas (Figuras 4-6). Os resultados foram superiores aos obtidos por DAS *et al.* (1998), que observaram estabilidade por apenas 20 horas, trabalhando com *Micrococcus*. Todos os isolados formaram emulsões consideradas estáveis, uma vez que seus volumes, 24 horas após a formação, ainda correspondiam a 50% ou mais do seu volume original (WILLUMSEN e KARLSON, 1979). Curiosamente, na maioria dos tratamentos, houve uma queda acentuada do volume das emulsões até 24 horas após a mistura, ocorrendo uma estabilização após esse período (Figuras 4-6). Ainda assim, volumes de emulsão estáveis acima de 70% foram freqüentemente obtidos. Esses resultados são relevantes para várias aplicações dos biossurfactantes, visto que a capacidade de emulsificação é importante na solubilização de compostos hidrofóbicos em processos de biorremediação (MIHELICIC *et al.*, 1993, VOLKERING *et al.*, 1995), na recuperação avançada de petróleo (BANAT *et al.*, 1995a), na remoção do óleo retido nas borras oleosas (BANAT *et al.*, 1991), entre outros.

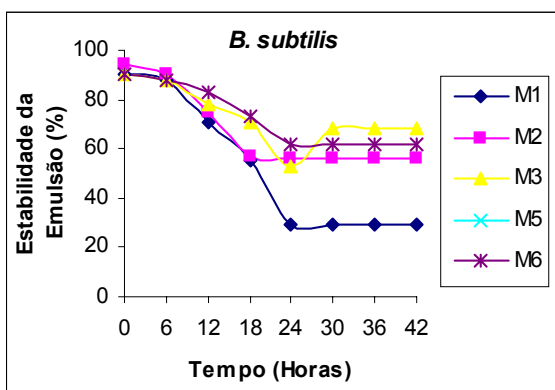
No meio M1, apenas o isolado 191 apresentou estabilidade maior do que a do padrão SDS, estabilizando a 55% após 24 horas; nos meios M4 e M6, somente os isolados 88A, 191 e 201 apresentaram maior estabilidade que o SDS (Figuras 4-6). Os dados permitem inferir que todos os isolados produzem metabólicos com propriedades de biossurfactantes e de bioemulsificantes, principalmente quando crescidos nos meios M2, M3 e M5, onde se obtiveram os menores valores de tensão interfacial (Quadro 5 e Figuras 3a-f) e os maiores índices de emulsificação (Figuras 4-6).



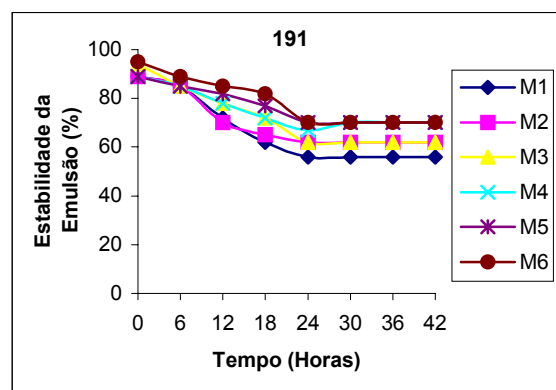
(a)



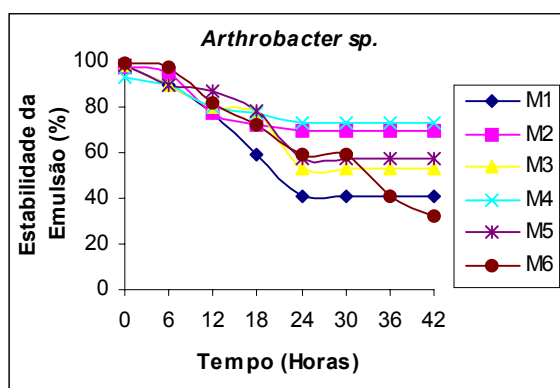
(b)



(c)

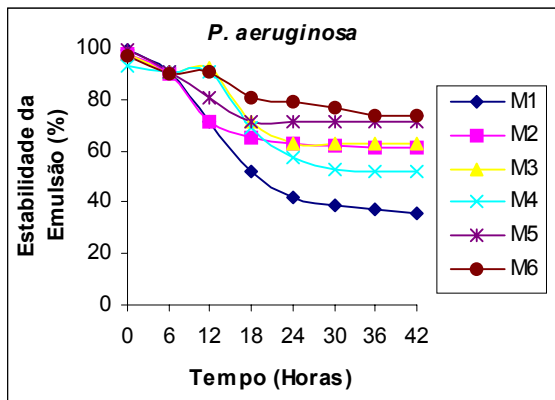


(d)

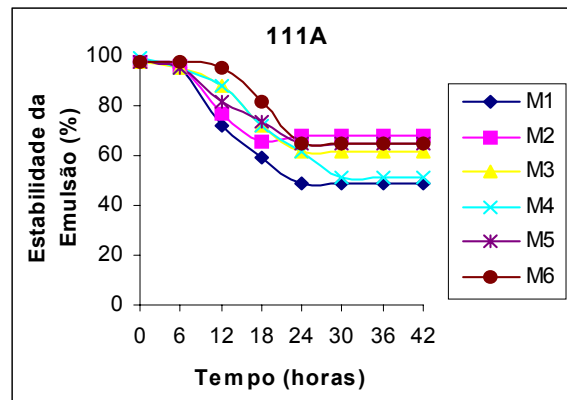


(e)

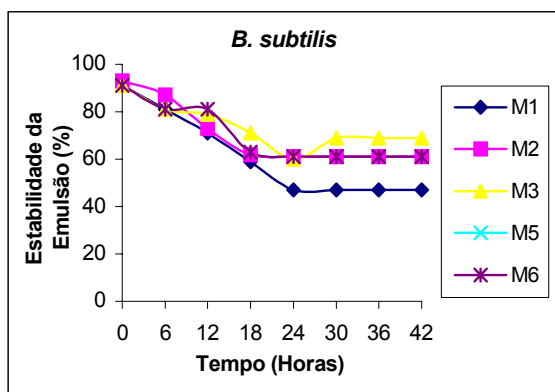
Figura 4. Estabilidade de emulsões formadas pela mistura de querosene com os sobrenadantes dos isolados crescidos em diferentes formulações de meio MM (Quadro 3) adicionado de borra oleosa (B) a 2% (v/v).



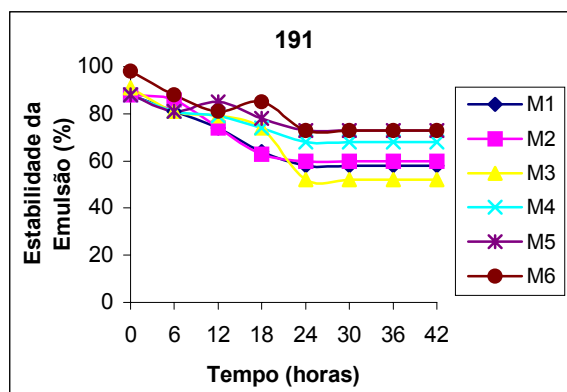
(a)



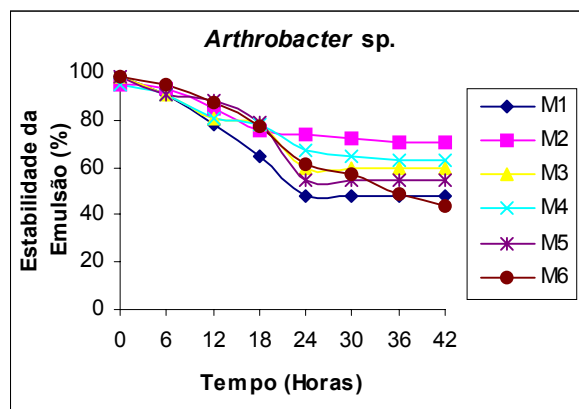
(b)



(c)

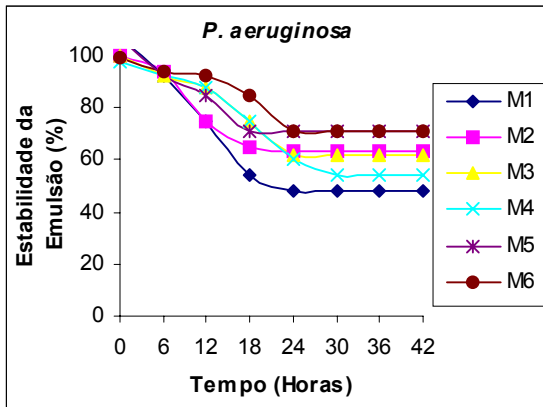


(d)

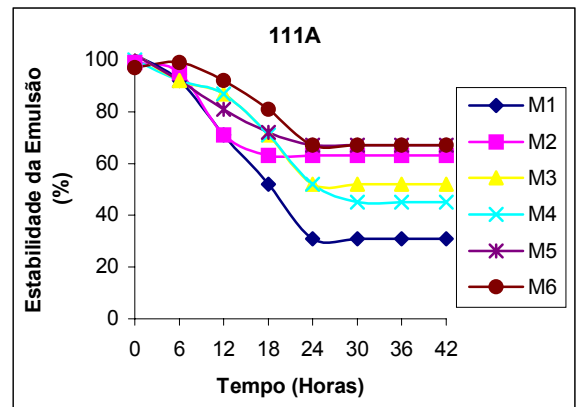


(e)

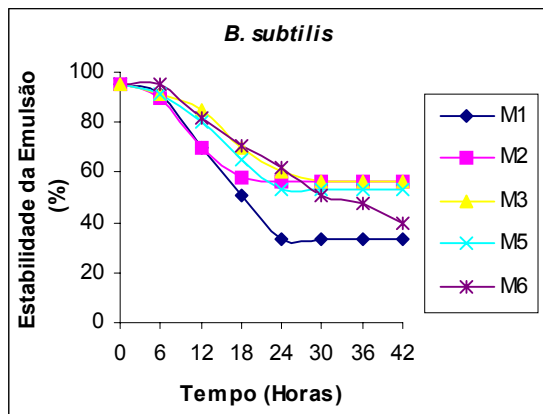
Figura 5. Estabilidade de emulsões formadas pela mistura de querosene com os sobrenadantes dos isolados crescidos em diferentes formulações de meio MM (Quadro 3) adicionado de dodecano (D) a 2% (v/v).



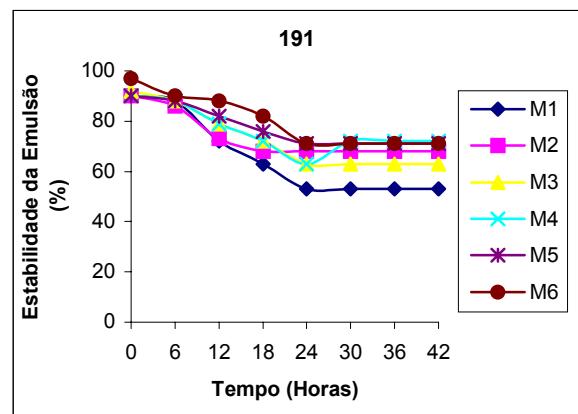
(a)



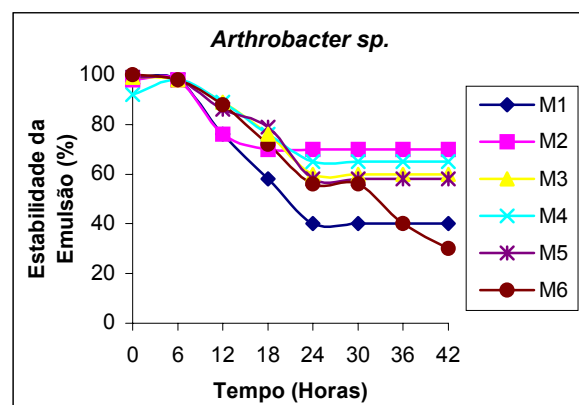
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 6. Estabilidade de emulsões formadas pela mistura de querosene com os sobrenadantes dos isolados crescidos em diferentes formulações de meio MM (Quadro 3) adicionado hexadecano (H) a 2% (v/v) .

O isolado 191, que é um actinomiceto, mostrou-se como o melhor produtor de biossurfactantes entre os isolados testados. Os actinomicetos são bactérias capazes de transformar, biodegradar ou utilizar como fonte de carbono, vários compostos hidrofóbicos. Essa capacidade pode ser de grande importância industrial e econômica (BICCA *et al*, 1999). O isolado 191 obteve valores de índices de emulsificação (E-24) acima de 50% em todos os meios testados, enquanto que uma bactéria do grupo *Rhodococcus* (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991), durante um processo de otimização de produção de biossurfactante, obteve um E-24 máximo de 40% em querosene. Este isolado apresentou ainda um comportamento bastante diferenciado dos demais quanto à capacidade de alteração do pH do meio de crescimento. O pH manteve-se sempre na faixa de 6,4 a 6,9 para os demais isolados, em todos os meios de cultura. No caso do isolado 191, o pH dos meios M5 e M6 foi reduzido para uma faixa entre 3,6 e 3,8, mas somente quando se utilizou dodecano ou hexadecano como fonte de carbono. Na presença da borra oleosa, os valores permaneceram entre 6,3 e 6,5. Curiosamente, observou-se também uma redução acentuada do pH no meio M6 cultivado com o isolado 111A, mas somente na presença de hexadecano. As causas para essas interações entre fontes de nutrientes minerais, fonte de carbono e pH não são ainda conhecidas, devendo seu estudo ser aprofundado. Entretanto, o comportamento do isolado 191 em relação ao pH, o coloca mais uma vez como uma opção interessante para a produção de biossurfactantes, já que a produção foi mantida mesmo com a queda reportada de pH. Especula-se, portanto, que o(s) biossurfactante(s) produzido(s) por esse isolado seja(m) estável (is) em pH ácido podendo, dessa forma, ter aplicações importantes em condições mais extremas quanto a essa variável.

4.5. Tratamento da Borra Oleosa com os Biossurfactantes Obtidos

É importante distinguir entre um biossurfactante eficiente e um biossurfactante eficaz. Eficiência é medida da concentração do biossurfactante necessária para reduzir significativamente a tensão superficial da água, enquanto eficácia é a medida do valor mínimo em que a tensão interfacial pode ser reduzida (PARKINSON *et al.*, 1985). Os meios contendo os biossurfactantes mais eficientes, produzidos durante a otimização, foram utilizados para tratar a borra oleosa, visando à separação entre o óleo e o material inerte. Alguns desses meios continham biossurfactantes em concentrações suficientes para manter a tensão interfacial abaixo de 40 mN m^{-1} mesmo após serem diluídos 10.000 vezes (Figuras 3a-f e Figuras 1A-F-Apêndice). Além disso, os biossurfactantes resistiram ao procedimento de esterilização por autoclavagem sem perda da atividade. O mecanismo para tratamento da borra oleosa ocorreu pela sorção dos hidrocarbonetos aos biossurfactantes durante a fase de agitação, efeito observado prontamente a partir do momento em que a agitação foi iniciada. O processo mostrou-se altamente eficiente em recuperar o óleo contido na borra oleosa (Quadros 6 e 6A-Apêndice A), chegando-se a 95% de redução do volume da borra. Esse valor é superior ao valor relatado por BANAT *et al.*(1991), que foi de cerca de 91%. A borra oleosa utilizada neste trabalho originou-se de um tanque de armazenamento de óleo combustível da RECAP, que restou do refino do óleo cru, sendo naturalmente constituído por frações mais pesadas e viscosas do petróleo. Além disso, esse óleo passou pelo processo de craqueamento catalítico e, portanto, a aderência das moléculas dos hidrocarbonetos à fração inerte, especialmente ao catalisador, pode ser mais expressiva do que a que ocorre em borra de óleo cru, como a usada por BANAT *et al.*(1991). Outro fator a ser considerado é a temperatura. No trabalho de BANAT *et al.* (1991), a temperatura estava próxima a 50°C ; neste trabalho, a temperatura foi mantida em 30°C . Considerando-se que a temperatura tem efeito significativo sobre a viscosidade (Quadro 4), pode-se concluir que os resultados obtidos foram altamente satisfatórios, o que faz desse processo uma alternativa promissora para a limpeza de tanques de armazenamento de óleo. Essa afirmação é ainda reforçada pela observação de que, na ausência dos biossurfactantes, a

recuperação do óleo foi insignificante, ficando em torno de 2% (Quadro 6 e 6A- Apêndice A).

Quadro 6 - Recuperação do óleo retido em borra oleosa proveniente de tanque de armazenamento de óleo combustível, após agitação com soluções de biossurfactantes produzidos por diferentes isolados microbianos

BIOSURFACTANTE (Isolado)	ÓLEO RECUPERADO (% do volume)
88A	93,5
191	88,5
111A	95,5
201	91,5
155	84
CONTROLE NEGATIVO	2



Figura 7. Separação de fases (óleo/água) após a quebra da emulsão pela adição de nitrato de magnésio.

5. CONCLUSÕES

Os substratos borra oleosa, dodecano e hexadecano foram capazes de suportar o crescimento dos microrganismos e a produção de biossurfactantes sob condições aeróbicas.

Alterações nas concentrações e nas fontes de nitrogênio, ferro e fósforo alteram significativamente a produção de biossurfactantes pelos isolados testados.

As melhores formulações de meios para a produção de biossurfactantes pelos isolados testados são as dos meios M3 e M5.

O isolado 191, um actinomiceto ainda não identificado, manteve uma elevada produção de biossurfactantes na maioria dos meios testados. A produção é mantida mesmo em condições que promovem a redução do pH para cerca de 3,8.

Os biossurfactantes produzidos foram eficientes na remoção do óleo retido em borra oleosa de tanque de armazenamento de óleo combustível, havendo recuperação de até 95% do volume total. Com isso, os sólidos passaram a conter uma quantidade insignificante de óleo residual, o que pode representar diminuição dos custos para o descarte do resíduo e redução de riscos de contaminação do ambiente pelo óleo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A. S., BANAT, I.M., HADITIRTO, S., KHAMIS, A. (1991) Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus bacterium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7: 53-61.

ABU-RUWAIDA, A. S., BANAT, I.M., HADITIRTO, SALEM, S., KADRI, M. (1991) Isolation of biosurfactant producing bacteria: product characterization and evaluation. **Acta Biotechnology**, 11: 315-324.

ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G. (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization, and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry Biophysics**, 31: 488-494.

ATLAS, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, 45: 180-209.

BANAT, I. M. (1995) Biosurfactant production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, 51: 1-12.

BANAT, I. M., SAMARAH, N., MURAD, M., HORNE, R., BARNEJEE, S. (1991) Biosurfactants production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7: 80-88.

BATISTA, S. B. (2002) Bactérias de ambientes contaminados com petróleo ou derivados produtores de biossurfactantes e emulsificantes. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 32p.

BICCA, C. F., FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. (1999) Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 30: 231-236.

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

BOGNOLO, G. (1998) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 152: 41-52.

CAMEOTRA, S. S. and MAKKAR, R. S. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50: 520-529.

CASSIDY, D. P. and HUDAK, A. J. (2001) Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. **Journal of Hazardous Materials**, 84: 253-264.

CHA, D. K. (2000) The effect of biosurfactants on the fate and transport of nonpolar organic contaminants in porous media. **Environmental Engineering**, 1: 1-17.

CHANG, Y. J., STEPHEN, J. R., RICHTER, A. P., VENOSA, A. D., REUGGEMANN, J., MACNAUGHTON, S. J., KOWALCHUK, G. A., HAINES, J. R., KLINE, E., WHITE, D. C. (2000) Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of proofing method. **Journal of Microbiological Methods**, 40: 19-31.

COOPER, D. G., ZAJIC, J. E. and GERSON, D. F. (1979) Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 37: 4-10.

COOPER, D. G., and ZAJIC, J. E. (1980) Surface active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, 42: 408-412.

COOPER, D. G., MACDONALD, C. R., DUFF, J. B. , KOVARIC, N. (1981a) Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. **Applied and Environmental Microbiology**, 42: 408-412.

COOPER, D. G., ZAJIC, J. E., DENIS, C. (1981b) Surface-active properties of a biosurfactant from *Corynebacterium lepus*. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, 58: 77-80.

DAS, M., DAS, S. K., MUKHERJEE, R. K. (1998) Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on *n*-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, 63: 231-235.

DESAI, J. D. and BANAT, I. M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61: 47-64.

DÉZIEL, E., LÉPINE, F., DENNIE, D. BOISMENU, D., MAMER, O. A. e VILLEMUR. R. (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on manitol or naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1440: 244-252.

DUVNJAK, Z. and KOVARIC, N. (1982) Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. **Biotechnology and Bioengineering**, 24: 165-175.

ELLIS, W. D. PAYNE, J. R., MONABB, G. D. (1985) **Treatment of contaminant soils with aqueous surfactants**. Washington: USEPA/ORD.

EHRlich, G. G. SCHROEDER, R. A., MARTIN, P. (1985) **Microbial populations in a jet-fuel contaminated aquifer at Tustin, California**. Washington: U.S. Geological Survey Report, 85pp.

FIEBIG, R., SCHULZE, D., CHUNG, J-C., LEE, S. T. (1997) Biodegradation of biphenyls (PCBs) in the presence of a bioemulsifier produced on sunflower oil. **Biodegradation**, 8: 67-75.

GARTSHORE, J. Y. C. L. and COOPER, D. G. (2000) Quantitative analysis of biosurfactants using fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Biotechnology Letters**, 22: 169-172.

GEORGIU, G., LIN, S. C., SHARMA, M. (1992) Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, 10: 60-65.

GHURYE, G. L. and VIPULANANDAN, C. (1994) A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, 44: 661-666.

GOBBERT, U., LANG, S., WAGNER, F. (1984) Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, 6: 225-230.

GUERRA-SANTOS, L. H., KAPPELI O., FIECHTER, A. (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology Biotechnology**, 24: 443-448.

GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O., FIECHTER, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, 48: 301-305.

HANFERBURG, D., HOMMEL, R., CLAUS, R., KLEBER, H. P. (1986) Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances Biochemical Engineering and Biotechnology**, 33: 53-93.

HEAD, I.M. (1998) Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, 144: 599-608.

IQBAL, S. KHALID, Z. M., MALIK, K. A. (1995) Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, 21: 176-179.

JAIN, D. K., COLLINS-THOMPSON, D. L., LEE, H., TREVORS, J. T. (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, 13: 271-279.

KARANTH, N. G. K., DEO, P. G., VEENANADIG, N. K. (1999) Microbial production of biosurfactant and their importance. Special Section: Fermentation. **Science and Technology**. 77: 116-126.

KOSARIC, N. CHOI, H. Y., BHASZEZYK, R. (1990) Biosurfactant production from *Nocardia* SFC-D. **Tenside Surfactants Detergents**, 27: 294-297.

KUYUKINA, M. S., IVSHINA, I. B., PHILP, J. C., CHRISTOFI, N., DUNBAR, S. A., RITCHKOVA, M. I. (2001) Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, 46: 149-156.

LANG, S. (2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. 7:12-20.

LIN, SUNG-CHYR, CHEN, YI-CHUAN, LIN, Y-M. (1998) General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. **Journal of Chromatography A**, 859: 149-159.

LOUVISSE, A. M. T., FREIRE, N. O. AND TEIXEIRA C. L. (1994) "Metodologia para caracterização de Borrás de Petróleo", in Anais da 1ª Mesa Redonda Sobre Química Analítica Ambiental, Petrobrás, Curitiba, PR.

MACELWEE, C. G., LEE, H., TREVORS, J. T. (1990) Production of extracellular emulsifying agent by *Pseudomonas aeruginosa* UG-1. **Journal of Industrial Microbiology**, 5: 25-52.

MIHELICIC, J. R., LUEKING, D. R., STAPLETON, J. M. (1993) Bioavailability of sorbed and separate-phase chemicals. **Biodegradation**, 4: 141-153.

MULLIGAN, C. N., MAHMOURIDES, G., GIBBS, B. F. (1989) The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, 12: 199-210.

MULLIGAN, C. N., YONG, R. N., GIBBS, B. F. (2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, 85: 111-125.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. (2002) Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25: 772-776.

OLLIS, D. (1992) Slick solution for oil spills. **Nature**, 358: 453-454.

PARKINSON, M. (1985) Biosurfactants. **Biotechnology**, 3: 65-83.

PASSERI, A., SCHIMDT, M., HAFFNER, T., WRAY, V. LANG, S., WAGNER, F. (1992) Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 37: 281 – 286.

RAMANA, K. V., KARANTH, N. G. (1989) Production of biosurfactants by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. **Biotechnology Letters**, 11: 437-442.

REASONER, D. J. and GELDREICH, E. E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Applied and Environmental Microbiology**, 49(1): 1-7.

ROBERT, M., MERCADE, M. E., BOSCH, M. P., PARRA, M. J., ESPUNY, M. A., MANRESA, M. A., GUINEA, J. (1989) Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. **Biotechnology Letters**, 11: 871-874.

ROSENBERG, E., ENGLANDER, E., HOROWITZ, A., GUTNICK, D. (1975) In: Bourquin, A. (Ed.), **Impact of the use of microorganisms on the aquatic environment**. EPA Report 600-3-75-001, p. 175-178.

SORIANO, A. U. and PEREIRA, N. (1998). Oily sludge biotreatment. **Biodegradation**. 8: 220-232.

SYLDATK, C., LANG., S., MATULOVIC, U., WAGNER, F. Z. (1985) Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp. DSM 2874. **Z. Naturforsch**, 40C: 61-67.

URURAHY, A. F. P., MARINS, M. D. M., VITAL, R. L., GABARDO, I. T., PEREIRA Jr., N. (1998) Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Journal of Brazilian Society for Microbiology**, 29: 254-258.

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

WEI, YU-HONG AND CHU, I-MING (1998) Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and MicrobiologyTechnology**, 22: 724-728.

WILLUMSEN, P. A. and KARLSON, U. (1997) Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**. 7: 415 – 423.

APÊNDICE A

Quadro 1A. Análise de variância entre os fatores (incluindo os desdobramentos)

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M	F	Pr > F
Bloco	1	6,800920	6,8009	7,76	0,066
Bactéria	4	1107,1685	276,7921	315,88	<.0001
Meio	5	8421,0776	84,21553	1922,03	<.0001
Característica	2	151,0291	75,5145	86,18	<.0001
Bactéria*meio	19	2099,6021	110,5053	126,11	<.0001
Bactéria*característica	8	1589,7422	19,1433	21,85	<.0001
Meio*característica	10	277,8579	27,7857	31,71	<.0001
Bactéria*meio*característica	38	559,1882	14,7154	16,79	<.0001
Erro	86	75,3590	0,8762		

Variável dependente: tensão
 Coeficiente de Variação: 2.48 %
 Média geral tensão: 37.72

Quadro 2A. Interação tripla bactéria*meio*característica (desdobramento dentro de fontes de carbono)

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M	F	Pr > F
B ¹	28	2834,9227	101,2472	7,76	<.0001
H ³	28	5070,4965	181,0891	206,66	<.0001
D ²	28	4660,6537	166,4519	189,96	<.0001

¹ B= Borra oleosa

² D= Dodecano

³ H= Hexadecano

Quadro 3A. Interação tripla bactéria*meio*característica (desdobramento dentro de bactérias)

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M	F	Pr > F
88A	17	1832,0500	107,7676	122,98	<.0001
111A	17	2856,4188	168,0246	191,75	<.0001
155	14	3119,4720	222,8194	254,28	<.0001
191	17	2267,7300	133,3958	152,23	<.0001
201	17	1589,7422	93,5142	106,72	<.0001

Quadro 4A. Interação tripla bactéria*meio*característica (desdobramento dentro de meios de cultura)

MEIO	G.L.	S.Q	Q.M	F	Pr > F
M1	14	939,4666	67,1047	76,58	<.0001
M2	14	335,6586	23,9756	27,36	<.0001
M3	14	79,0320	5,6451	6,44	<.0001
M4	11	1354,2800	123,1163	140,50	<.0001
M5	14	55,1546	3,9396	4,50	<.0001
M6	14	1587,9120	113,4222	129,44	<.0001

Quadro 5A- Análise de variância entre os tratamentos de recuperação do óleo retido em borra oleosa proveniente de tanque de armazenamento de óleo combustível, após agitação com soluções de biossurfactantes produzidos por diferentes isolados microbianos

F.V.	G.L.	S.Q	Q.M	F
Tratamento (T)	5	13245,6666	2649,1333	1324,5667
Resíduo	6	12,0000	2,0000	
Total	11	13257,6666		

Variável dependente: Biossurfactante (isolado)

Coefficiente de Variação: 1,86 %

Média geral do óleo recuperado: 75,83

Quadro 6A- Médias dos valores de recuperação do óleo retido em borra oleosa proveniente de tanque de armazenamento de óleo combustível, após agitação com soluções de biossurfactantes produzidos por diferentes isolados microbianos

BIOSSURFACTANTE (isolado)	ÓLEO RECUPERADO (% do volume)
88A	93,5 ab
191	88,5 bc
111A	95,5 a
201	91,5 ab
155	84,0 c
CONTROLE NEGATIVO	2,0 d

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

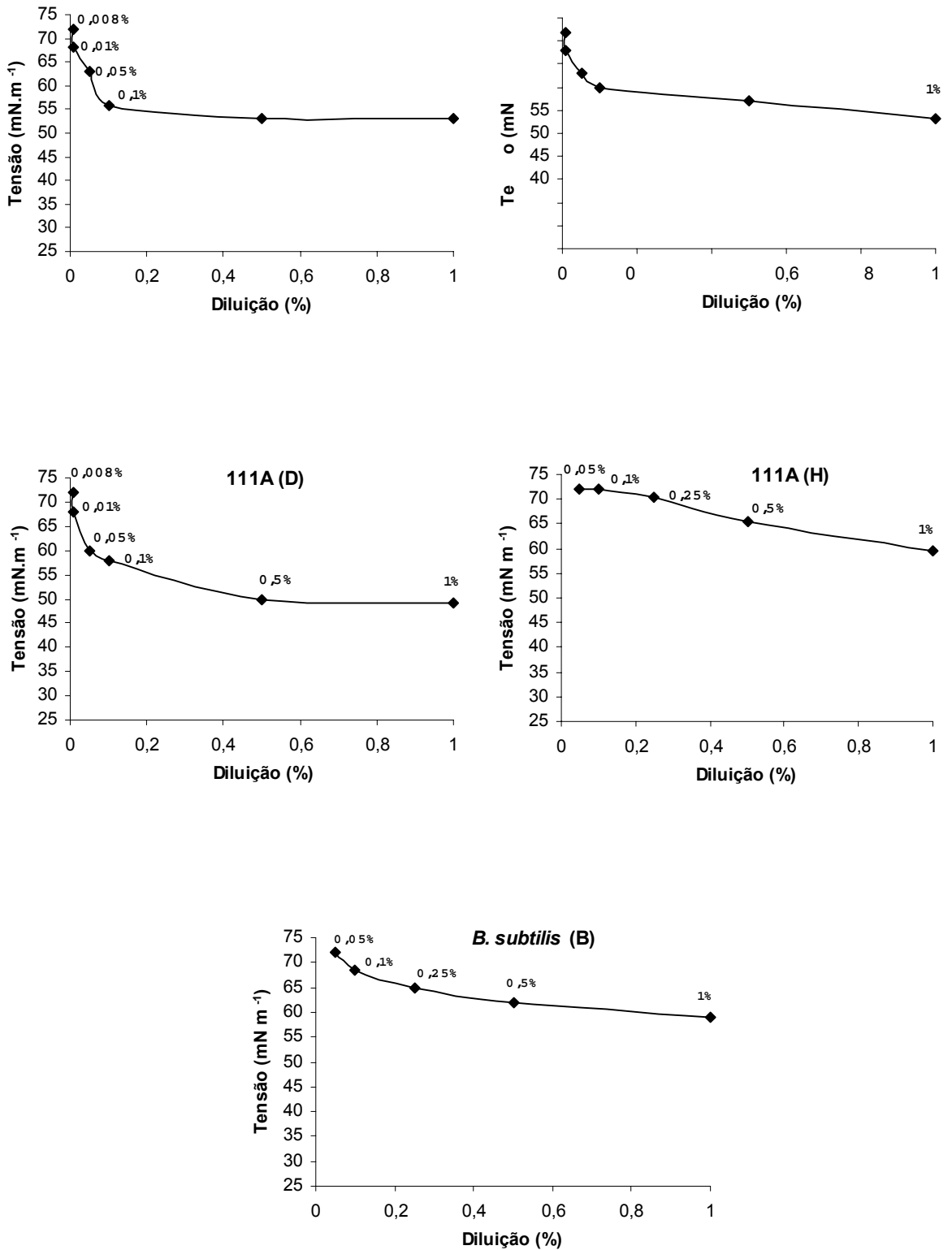


Figura 1A. Tensão interfacial do meio de cultura M1 suplementado com borra oleosa (B), dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

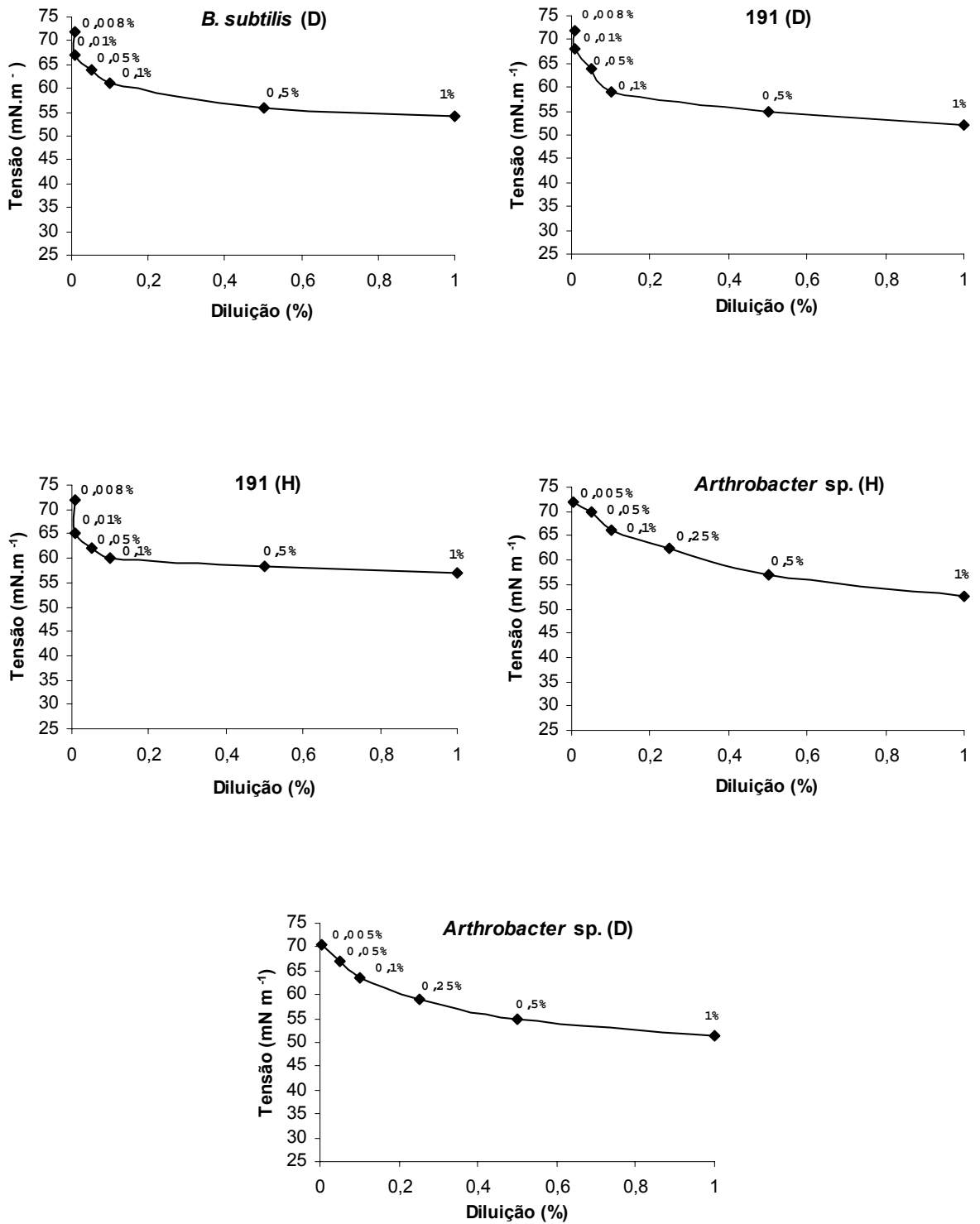


Figura 1A. (Cont.) Tensão interfacial do meio de cultura M1 suplementado com dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

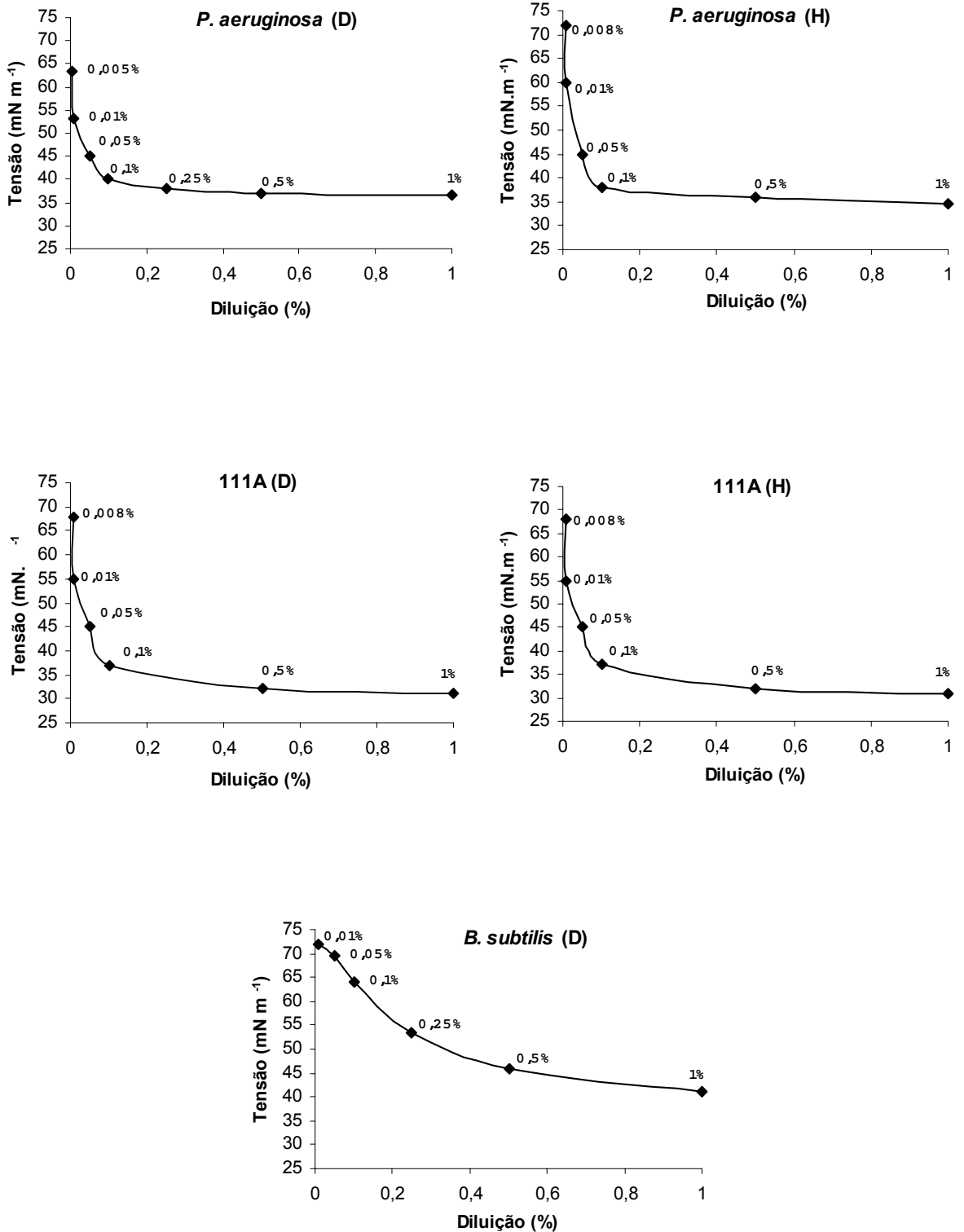


Figura 1B. Tensão interfacial do meio de cultura M2 suplementado com borra oleosa (B), dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

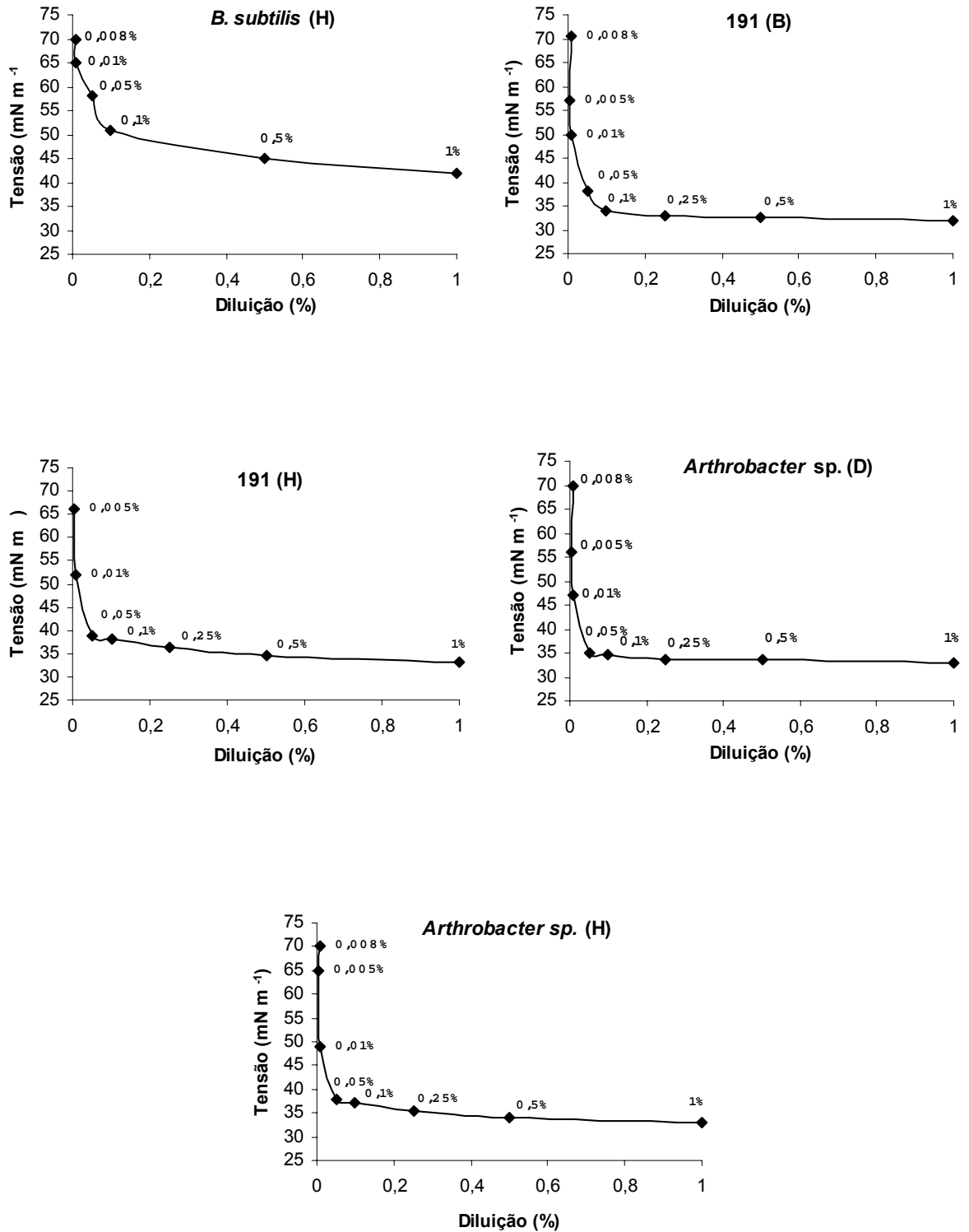


Figura 1B. (Cont.) Tensão interfacial do meio de cultura M2 suplementado com borra oleosa (B), dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

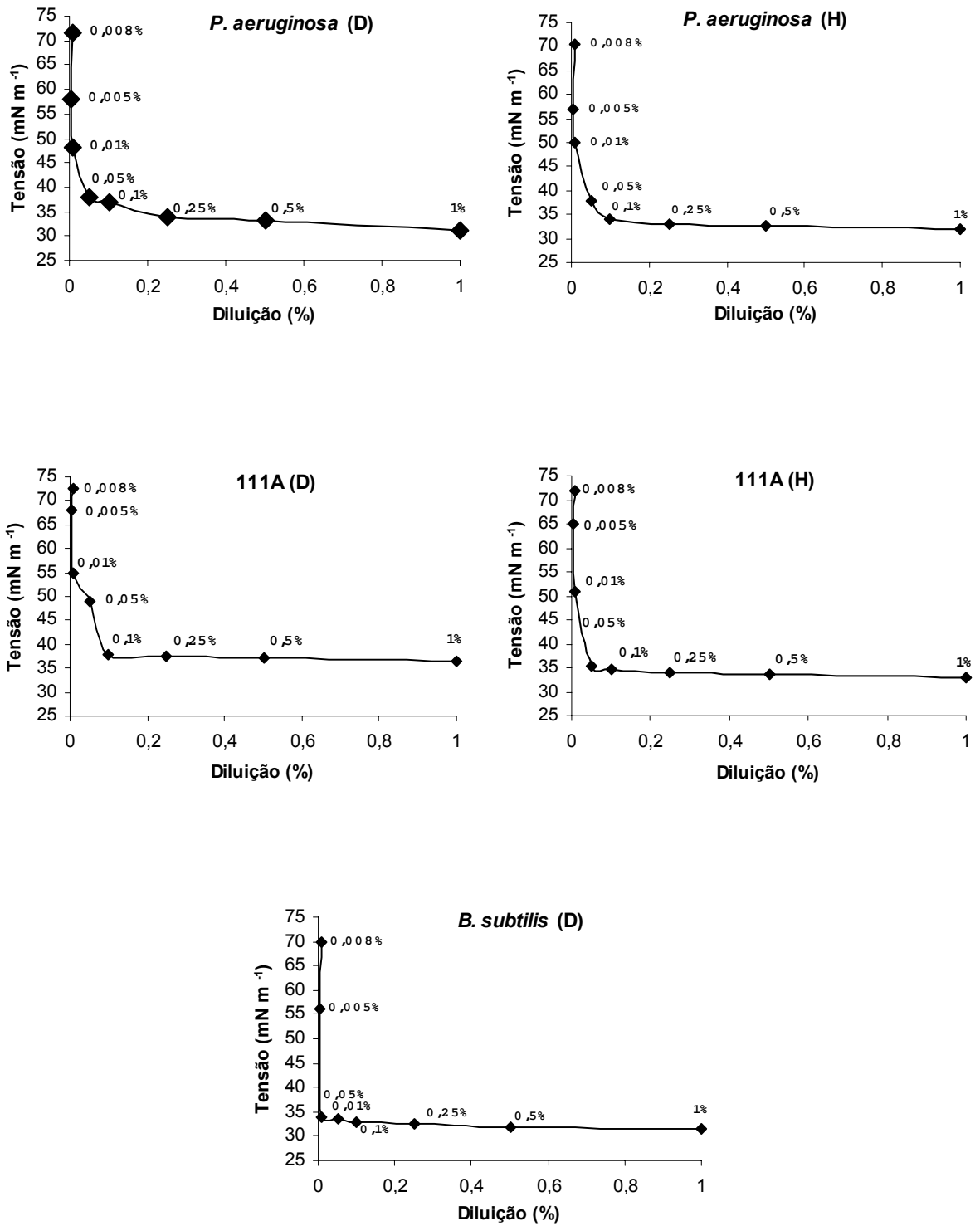


Figura 1C. Tensão interfacial do meio de cultura M3 suplementado com dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

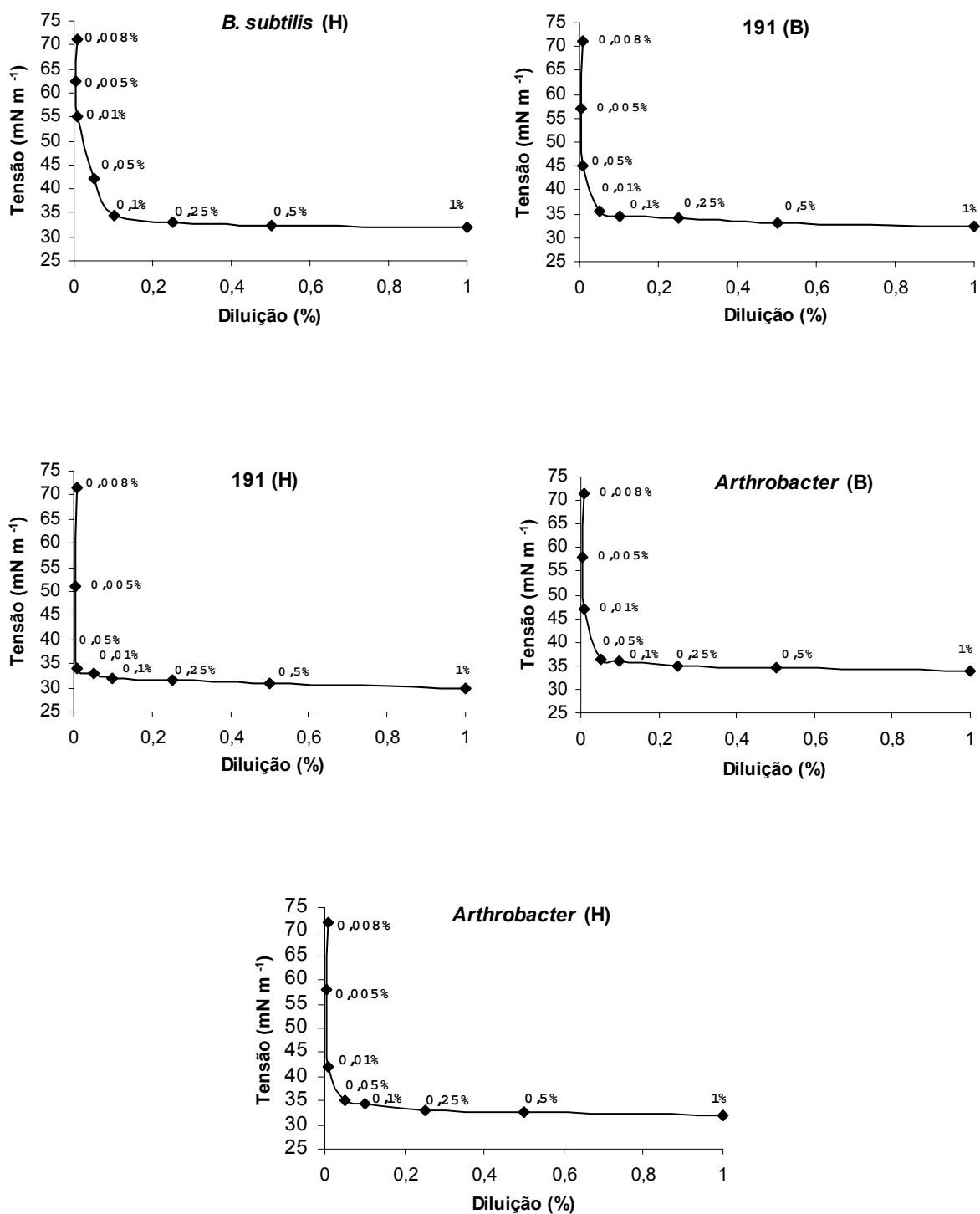


Figura 1C. (Cont.) Tensão interfacial do meio de cultura M3 suplementado com borra oleosa (B) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

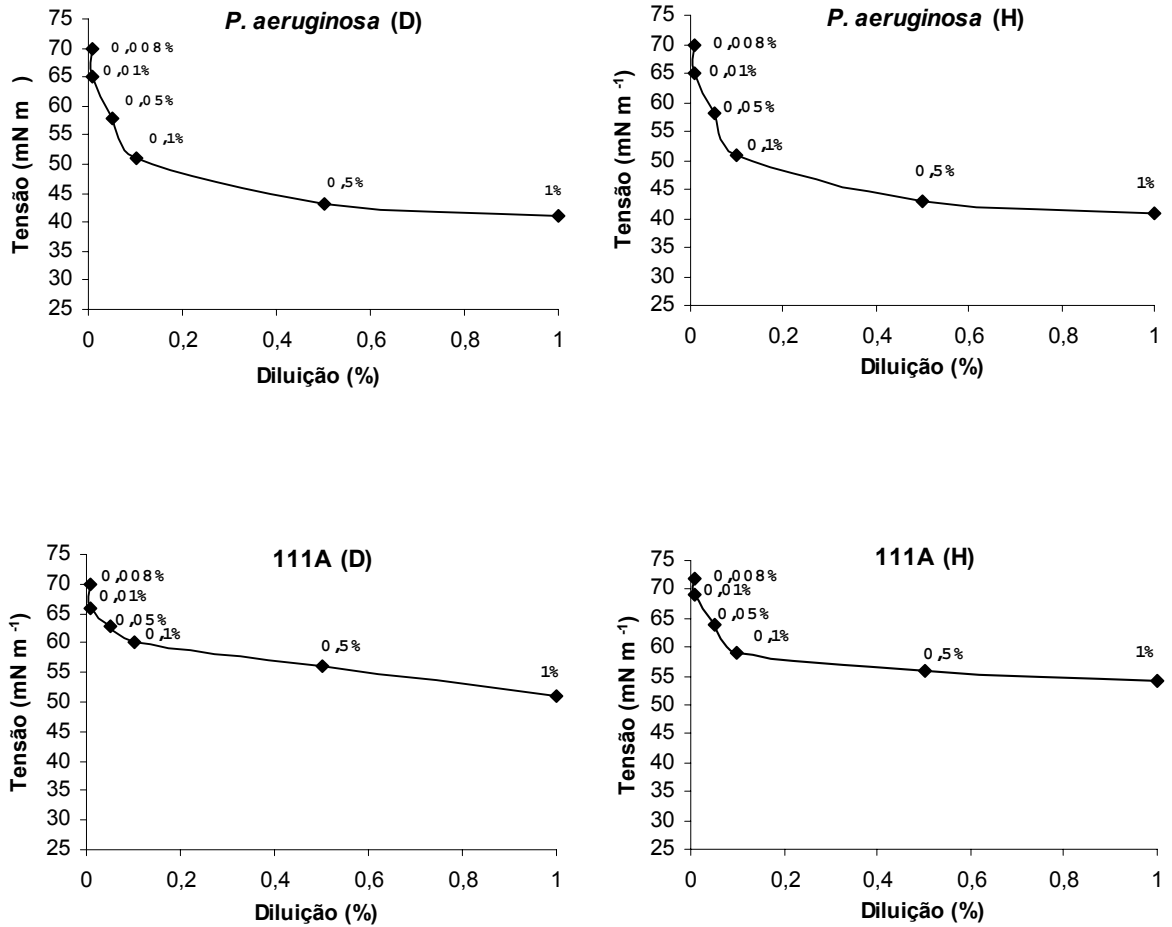


Figura 1D. Tensão interfacial do meio de cultura M4 suplementado com dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

- O isolado 155 não foi capaz de crescer nesse meio de cultura.

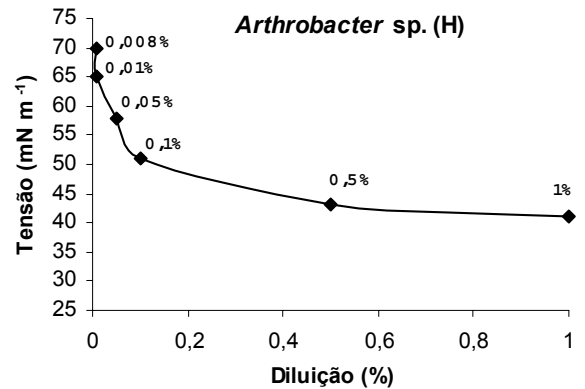
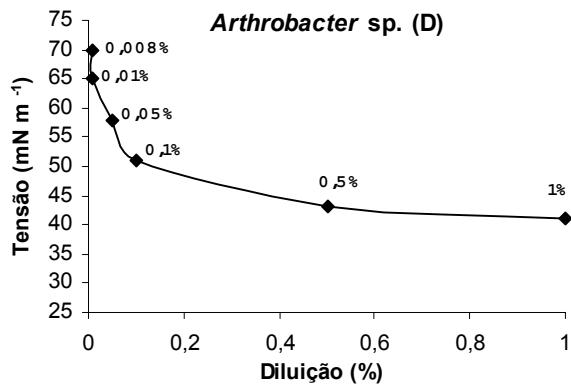
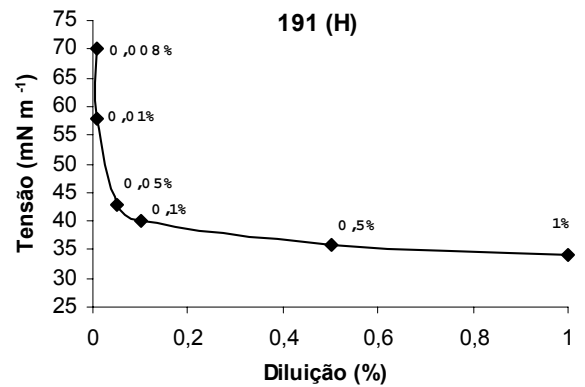
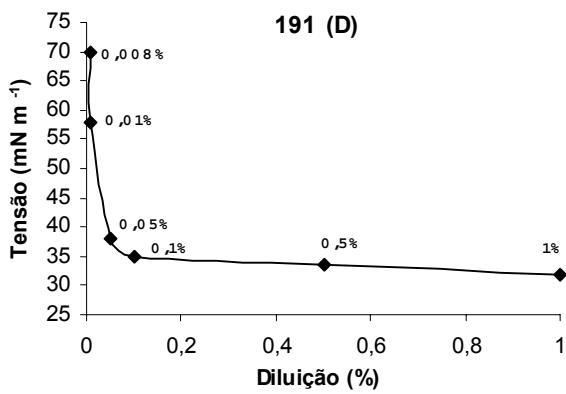


Figura 1D. (Cont.) Tensão interfacial do meio de cultura M4 suplementado com dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

- O isolado 155 não foi capaz de crescer nesse meio de cultura.

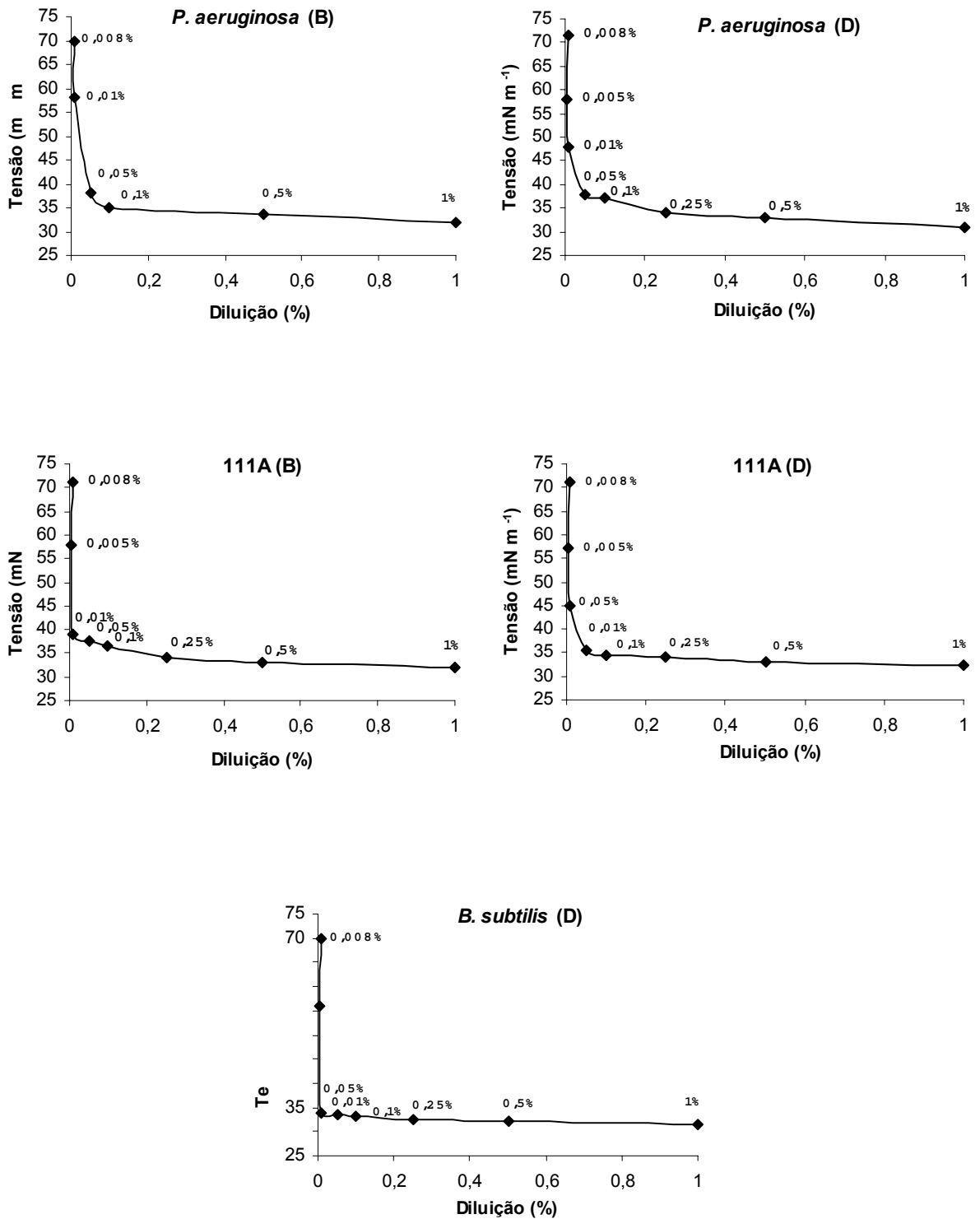


Figura 1E. Tensão interfacial do meio de cultura M5 suplementado com borra oleosa (B) ou dodecano (D) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

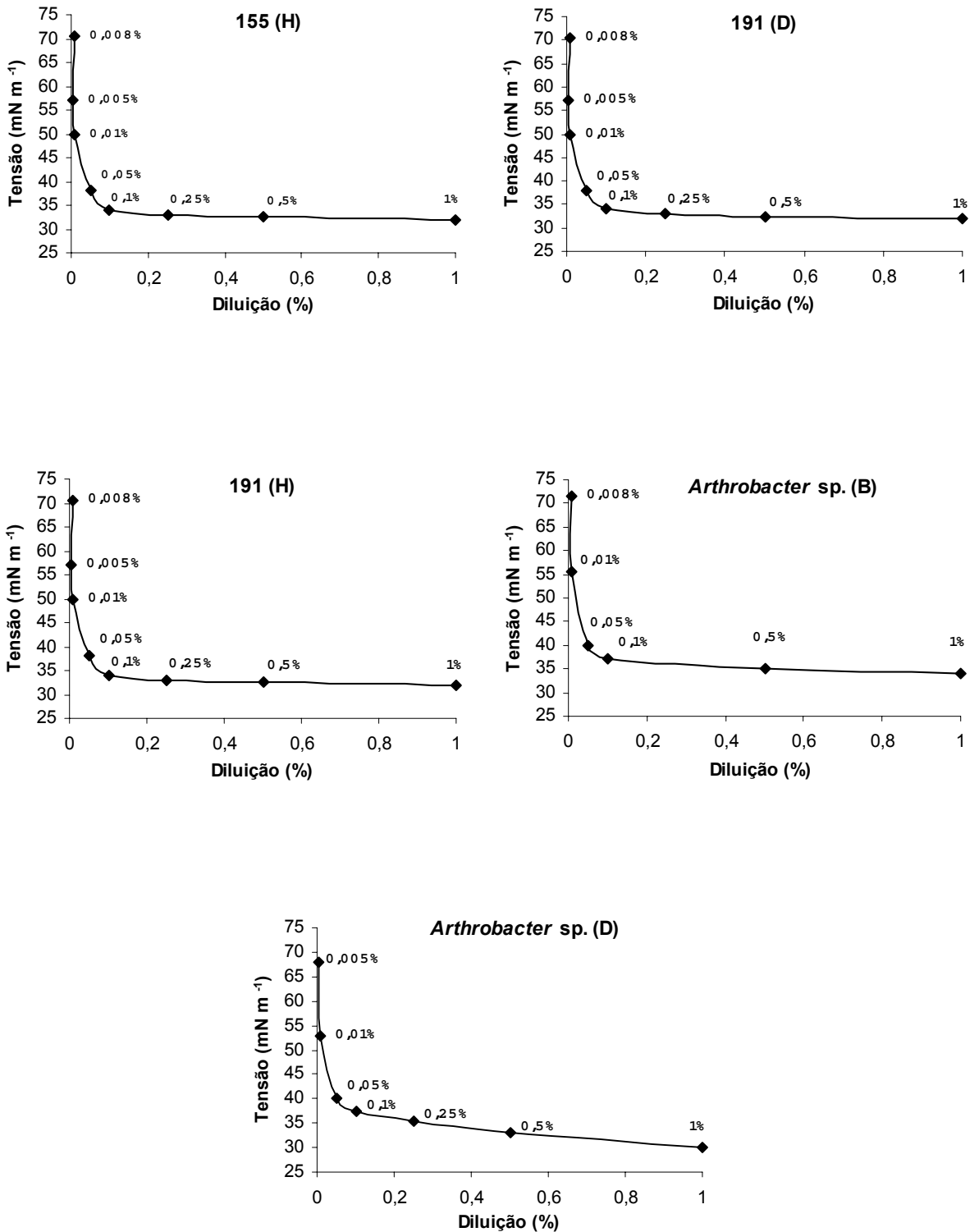


Figura 1E. (Cont.) Tensão interfacial do meio de cultura M5 suplementado com borra oleosa (B), dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

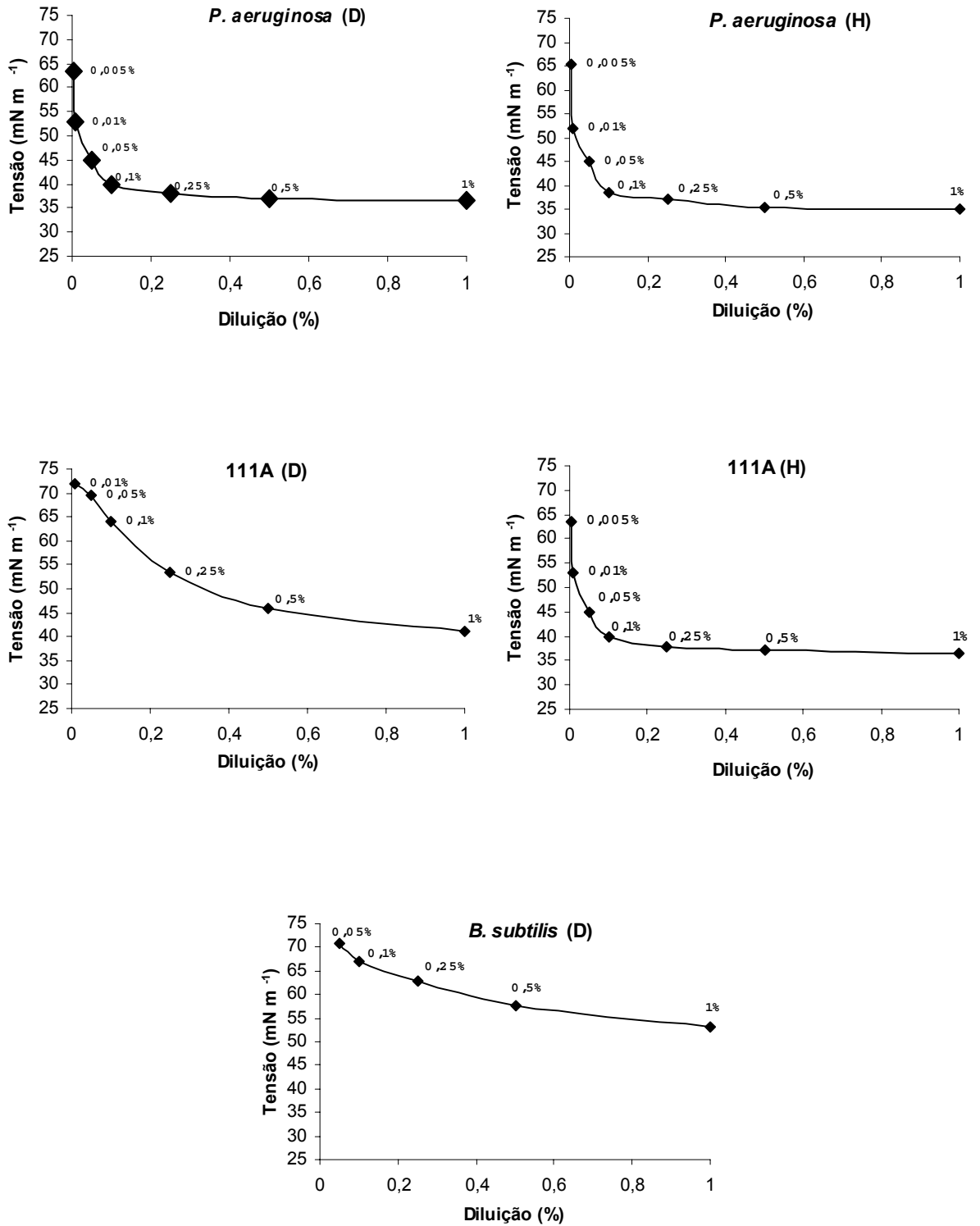


Figura 1F. Tensão interfacial do meio de cultura M6 suplementado com dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.

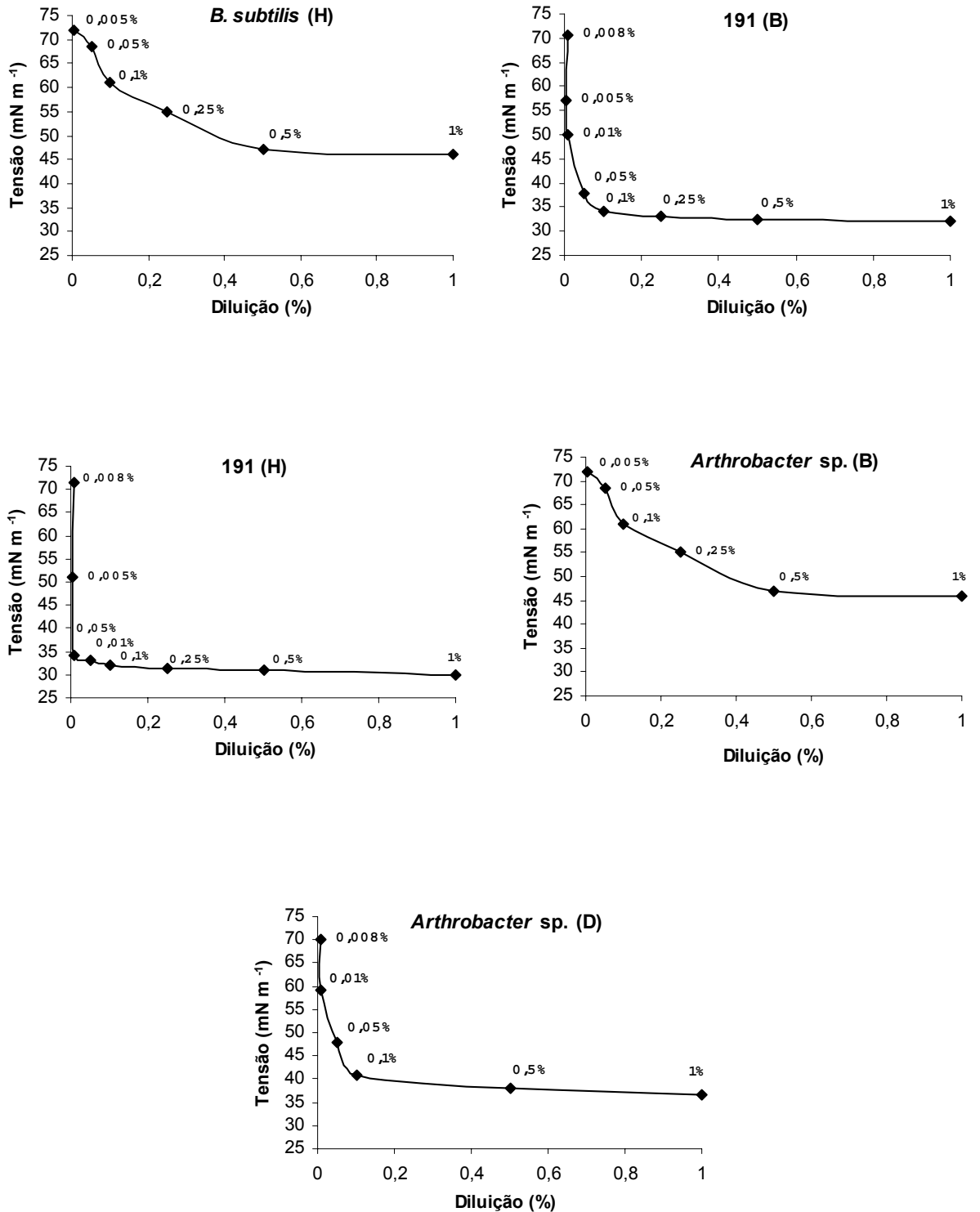


Figura 1F. (Cont.) Tensão interfacial do meio de cultura M6 suplementado com borra oleosa (B), dodecano (D) ou hexadecano (H) a 2% (v/v) sem células, em função das diluições dos meios de cultura, após o cultivo dos isolados por 7 dias, 30°C e 200 rpm.