

Monografia de Graduação

ANÁLISE DA BIODECOMPOSIÇÃO DE ÓLEO BRUTO ATRAVÉS DA *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

Jéssica Maria Damião de Arruda Câmara

Natal, Dezembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
NÚCLEO DE PESQUISA EM PETRÓLEO E GÁS NATURAL

MONOGRAFIA ANP

ANÁLISE DA BIODECOMPOSIÇÃO DE
ÓLEO BRUTO ATRAVÉS DA *PSEUDOMONA*
AERUGINOSA

JÉSSICA MARIA DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA

Natal-RN

Dezembro-2013

CÂMARA, Jéssica Maria Damião de Arruda – Análise da Biodecomposição de Óleo Bruto Através da *Pseudomona aeruginosa*, Monografia, UFRN, Departamento de Engenharia Química, Programa de Recursos Humanos – PRH14/ANP. Áreas de Concentração: Engenharia Ambiental em Remoção de Contaminantes Hidrocarbonados, Natal/RN, Brasil

Orientadora: Profa. Dra. Magna Angélica dos Santos Bezerra Sousa

Resumo: Devido à crescente utilização de combustíveis fósseis e seu manejo inadequado, a contaminação de solo por hidrocarbonetos tem aumentado nos últimos anos provocando um grave desequilíbrio ao meio ambiente. Visando reduzir esse problema faz-se necessário o estudo de metodologias remediadoras. É com esse intuito que foi analisada a eficácia da utilização de microrganismos do gênero *Pseudomonas*, na recuperação de áreas contaminadas por combustíveis fósseis. Esse processo, chamado biorremediação, consiste na utilização de microrganismos com a capacidade de biotransformar moléculas poluentes em nutrientes para o seu metabolismo, retirando os contaminantes do ambiente. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial de biodegradabilidade do gênero *Pseudomonas* em soluções contendo concentrações de óleo bruto e diesel. Os experimentos ocorreram em quatro etapas. Primeiramente, as bactérias foram desenvolvidas em solo e preservadas para posterior utilização. Na segunda etapa, foi feita a análise do solo para identificação e quantificação do grupo. Em seguida, ocorreu o desenvolvimento de bactérias adaptadas em erlenmeyers para determinação do seu crescimento, produção de biossurfactante e consumo de carbono. Passada essa etapa, as *Pseudomonas* foram inoculadas em microcosmos contaminados com quantidades conhecidas de óleo bruto e diesel para determinação de sua capacidade de biorremediação. Com os dados obtidos ao longo da pesquisa, foi possível concluir que o uso do grupo *Pseudomonas* para a remediação de áreas contaminadas se mostrou um método promissor, pois os microrganismos foram capazes de remover uma alta porcentagem dos contaminantes do solo.

Palavras-chave: contaminação, óleo bruto, biorremediação, *Pseudomonas aeruginosas*.

ABSTRACT**Analysis of crude oil biodecomposition through the *Pseudomona aeruginosa*.**

Due to the growing use of fossil fuels and its inadequate management, the soil contamination by hydrocarbons has recently increased causing a severe unbalance to the environment. Aiming to reduce the aforementioned problem, it becomes necessary to study corrective methodologies. It is that goal the application effectiveness of bacteria from the genera *Pseudomonas* in order to recover areas contaminated by fossil fuels will be analyzed. This process, known as bioremediation, consists of using microorganisms that present the ability to turn pollutant molecules into nutrients for their own metabolism to remove them from the environment. The objective of this study is to evaluate the biodegradability potential of the *Pseudomona* bacteria when used with solutions containing different concentrations of crude oil and diesel. The experiments had four steps. At first, the bacteria were grown in soil and preserved for future utilization. The second step consisted of soil analysis for group identification and quantification. Then, adapted bacteria were grown in erlenmeyers in order to determine their growth rate, biosurfactants production and carbon consumption. Finally, the *Pseudomonas* bacteria were inoculated into contaminated microcosms containing known amounts of crude oil and diesel so their bioremediation capacity could be determined. From the data obtained throughout the research, it was possible to observe that the utilization of the *Pseudomonas* bacteria for contaminated areas remediation proved itself as a promising method, since the microorganisms were able to remove a high percentage of the contaminants from the soil.

Key words: contamination, crude oil, bioremediation, *Pseudomonas aeruginosas*.

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio e compreensão durante estes cinco anos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado saúde, benção e luz para chegar ao final de um curso tão difícil e cheio de obstáculos.

Um agradecimento especial à minha família, que sempre me amou e nunca duvidou da minha capacidade, mesmo quando eu não achava que seria possível. Para a minha mãe, minha, MAGALÍ NEUMA DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA, que sempre me apoiou e incentivou a fazer as minhas próprias escolhas, além de sempre pedir em suas orações que tudo ocorresse como o planejado nesses experimentos; ao meu pai, SAULO DE ARRUDA CÂMARA, pelo exemplo de caráter que sempre terei como referência para o resto da vida; aos meus irmãos DANIELLE DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA, que sempre me apoiou e ajudou dentro das suas possibilidades, e BRUNO DAMIÃO DE ARRUDA CÂMARA, que mesmo distante tenho a certeza que sempre estava torcendo por mim.

Aos meus amigos Iêda Letícia Mendes Silva, Luiz Gonzaga Lopes Neto, Millene Caroline Albino de Oliveira, Roger Williams de Souza Lima e Tahyná Barbalho Fontoura, o “Grupo Lamental”, que ao longo desses cinco anos foram meus companheiros para todas as horas e um apoio, me mantendo firme no curso, principalmente quando fazíamos a loucura de pagar tantas matérias em um único semestre. Tenho certeza que com a capacidade e a determinação que me mostraram, vocês terão um lindo futuro pela frente, independente do caminho que escolherem. E aos demais amigos, que mesmo não sendo citados foram importantes no decorrer dessa vida acadêmica.

Aos meus professores pelo conhecimento transmitido, em especial à minha tutora Josette Lourdes de Sousa Melo, por ter me tornado uma pessoa e uma profissional melhor; à minha orientadora Magna Angélica dos Santos Bezerra Sousa, por ter aceitado essa tarefa, pela paciência e pela ajuda fornecida nesta reta final; e à Anita Maria de Lima, pela ajuda e dedicação em transmitir seus conhecimentos. E aos demais professores, que mesmo não sendo citados, tiveram uma parcela importantíssima na minha formação.

À Petrobrás e à Agência Nacional de Petróleo pela concessão da bolsa e pelos recursos investidos nesse projeto, permitindo que este fosse realizado da melhor forma possível.

Meu muito obrigado a todos que fazem parte da minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização dessa etapa.



“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo das forças intermoleculares.	25
Figura 2: Estrutura dos ramnolipídeos 1-4	30
Figura 3: Fluxograma das etapas adotadas no experimento.....	31
Figura 4: Mapa de localização do Campo de Fazenda Belém	32
Figura 5: Solo contaminado com areia para desenvolvimento das bactérias. ...	33
Figura 6: Mecanismo para transferência das bactérias da areia para água.....	34
Figura 7: <i>Pseudomonas</i> preservadas em skin milk.	35
Figura 8: Solução de peptona após 24 horas de incubação.....	36
Figura 9: Ensaio com glicerina.	37
Figura 10: Curva de calibração para a ramnose	39
Figura 11: Curva de calibração para DQO	41
Figura 12: Microcosmos utilizados para o ensaio de biorremediação. A) Contaminado com óleo bruto B) Contaminado com diesel.....	42
Figura 13: Extrator utilizado na análise de óleos e graxas.	44
Figura 14: Quantificação das bactérias em solo.....	45
Figura 15: Efeito da concentração de glicerina no crescimento celular.....	46
Figura 16: Meio de cultivo com 10% de glicerina inoculada (312 horas de incubação).....	47
Figura 17: Produção de biossurfactante em termos de Ramnose.....	48
Figura 18: Curva do consumo de substrato.....	49
Figura 19: A) Controle e óleo bruto após emulsificação; B) Controle e diesel após emulsificação.....	50
Figura 20: Porcentagem de petróleo presente no solo.....	51
Figura 21: Porcentagem de diesel presente no solo.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos e estratégias de bioremediação do solo	20
Tabela 2: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvido.....	28
Tabela 3: Composição do meio mineral	37
Tabela 4: Porcentagem de emulsificação.....	50
Tabela 5: Resultados da remoção de óleos e graxas.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS	16
3.2 CONTAMINAÇÃO CAUSADA PELO ÓLEO BRUTO	17
3.3 BIORREMEDIAÇÃO	19
3.3.1 Atenuação natural	20
3.3.2 Bioestimulação	21
3.3.3 Bioventilação	22
3.3.4 Bioaugmentação	22
3.4 DINÂMICA DOS COMPOSTOS DO ÓLEO BRUTO NO SOLO	23
3.5 TENSÃO SUPERFICIAL	25
3.6 SURFACTANTES	26
3.7 BIOSSURFACTANTES	26
3.8 PRINCIPAIS BIOSSURFACTANTES E OS MICRORGANISMOS PRODUTORES	28
3.9 <i>PSEUDOMONA AERUGINOSA</i>	29
3.10 RAMNOLIPÍDEOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS EM SOLO	32
4.2 ANÁLISE DO SOLO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	33

4.3 PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	34
4.4 DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS PRESERVADAS	35
4.5 ENSAIO PARA ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE.....	35
4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	38
4.6.1 Determinação da concentração celular	38
4.6.2 Determinação da concentração de biosurfactante.....	38
4.6.3 Determinação da concentração de carbono	40
4.6.4 Determinação do índice de emulsificação (E24)	42
4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O TESTE DE BIODEGRADAÇÃO ...	42
4.7.1 Preparo da suspensão celular	43
4.7.2 Análise de óleos e graxas	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 RESULTADO DO DESENVOLVIMENTO DAS PSEUDOMONAS EM SOLO.....	45
5.2 ENSAIO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS	46
5.2.1 Crescimento celular.....	46
5.2.2 Produção de biosurfactante.....	47
5.2.3 Consumo da fonte de carbono	49
5.2.4 Determinação do índice de emulsificação	49
5.3 TESTE DE BIODEGRADAÇÃO	50
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O crescente avanço da tecnologia, desde o início da revolução industrial, vem demandando uma quantidade cada vez maior de recursos naturais, o que causa um desequilíbrio no meio ambiente, seja pelo uso indiscriminado ou pela introdução de produtos químicos em determinados locais. Um dos principais problemas é o derramamento de petróleo e seus derivados, que têm contribuído para a contaminação do solo com hidrocarbonetos em todo planeta. Isso é causado principalmente pelas atividades de extração, transporte e refinamento.

Diante disso, observa-se com muita preocupação, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (SOUZA et al., 2010). Desta forma, há a necessidade de disponibilizar vários recursos para o desenvolvimento de novas tecnologias de remediação e limpeza.

Os métodos tradicionais, como a contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes e a adsorção por materiais naturais ou sintéticos, não se apresentam como um método efetivo, pois estes não promovem a degradação do petróleo.

Assim, uma das técnicas mais estudadas atualmente é a biodegradação, ou seja, a utilização de grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Este método torna-se efetivo, uma vez que, o petróleo é usado como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular (ZHANG et al., 2005).

Porém, existe um fator que limita a biodegradação dos poluentes; segundo Kronenberg (2007) é a limitada disponibilidade destes compostos aos microrganismos, já que hidrocarbonetos geralmente se agregam aos componentes do solo, dificultando sua remoção ou degradação.

E como a biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos depende da capacidade de assimilação desses compostos pelos microrganismos, há a necessidade da utilização de microrganismos que crescem na presença de contaminantes oleosos produzindo biossurfactantes.

Os biossurfactantes são moléculas que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, provocando a separação de interfaces com diferentes graus de polaridade, tais como as interfaces óleo/água. Essa propriedade aumenta a solubilidade e a disponibilidade de poluentes hidrofóbicos aos microrganismos, aumentando o potencial de biodegradação.

Diversos tipos microbianos são capazes de produzir biossurfactantes, tais como bactérias. Um dos compostos biossurfactantes mais investigados são os ramnolípídeos, produzidos pelo grupo *Pseudomonas*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Objetivou-se analisar a capacidade de biorremediação dos solos contaminados com óleo bruto e seus derivados através da *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sumarizando, este trabalho possui os seguintes objetivos:

- Desenvolver uma cepa bacteriana do gênero *Pseudomonas* adaptada à degradação de compostos hidrocarbonados.
- Avaliar o potencial de crescimento, produção de biossurfactante e de consumo de carbono da bactéria desenvolvida.
- Avaliar o potencial de biorremediação do gênero *Pseudomonas*, utilizando a técnica de bioaugmentação.
- Comparar os resultados da técnica de bioaugmentação em relação à atenuação natural.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

O petróleo é uma fonte de energia não renovável e de origem fóssil, cuja formação se deu a milhões de anos a partir da decomposição de pequenos organismos marinhos, plâncton e vegetação típica de regiões alagadiças (FONSECA, 1992). Devido à permeabilidade e a porosidade das rochas sedimentares, suas bacias são os principais locais de ocorrência de petróleo, com a formação de grandes reservatórios economicamente exploráveis (RAMOS, 2006).

As características do petróleo dependem de sua composição, sendo, geralmente, um líquido escuro acastanhado, de consistência oleosa, de cheiro desagradável e coloração que pode variar do preto ao castanho, originando-se da decomposição de animais e vegetais marinhos soterrados em desabamentos da crosta terrestre em épocas remotas. Alguns podem ser escuros, densos e viscosos, com pouco gás, enquanto outros podem apresentar tonalidades mais claras, baixa densidade e viscosidade, com quantidade expressiva de gás, em função dos diferentes reservatórios em que os óleos são obtidos.

Esta fonte de energia é composta principalmente de uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros componentes em menor quantidade. Esses hidrocarbonetos constituídos predominantemente por carbono e hidrogênio podem ser divididos em quatro frações: alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos. As duas primeiras se caracterizam por serem mais leves, enquanto as outras duas compreendem as frações mais pesadas. A fração dos compostos alifáticos inclui os alcanos, alcenos e cicloalcanos. Já a fração dos compostos aromáticos compreende os hidrocarbonetos mono aromáticos voláteis, tais como, benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xilenos (BTEX) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), como os naftenoaromáticos. As resinas e os asfaltenos são constituídos de moléculas polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, no entanto, as resinas são caracterizadas por serem sólidos amorfos dissolvidos no óleo, enquanto os asfaltenos são grandes moléculas coloidais dispersas no óleo (BALBA et al., 1998). No petróleo podem-se encontrar ainda traços de metais como vanádio,

níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio, mas a proporção destes metais, bem como das demais frações do petróleo podem estar associadas à formação geológica do local de origem, tempo decorrido e a migração do mesmo (RAMOS, 2006).

Em geral, todas as formas do petróleo são compostas quase que completamente por átomos de carbono e de hidrogênio, com menores proporções de nitrogênio e oxigênio (Solomons, 1996). De acordo com Borsato et al. (2009), os hidrocarbonetos constituintes do petróleo têm sua composição variável em: 83 a 87% de carbono e 11 a 15 % em hidrogênio, além de pequenas quantidades de nitrogênio (0 a 0,5%), enxofre (0 a 6%), oxigênio (0 a 3,5%), chamados de compostos orgânicos polares, e mínimas porções de organometálicos.

Desta forma, dependendo da origem do petróleo, a composição química e as propriedades físicas do óleo bruto podem variar de forma abrangente, e é devido a esses fatores que se encontram dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas com essa substância.

3.2 CONTAMINAÇÃO CAUSADA PELO ÓLEO BRUTO

O crescente avanço da tecnologia, desde o início da revolução industrial, vem demandando uma quantidade cada vez maior de recursos naturais, o que causa um distúrbio no meio ambiente, seja pelo uso indiscriminado ou pela introdução de produtos químicos a um determinado local.

Com isso, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas por vazamento/derramamento de combustíveis vêm crescendo, sendo diversas as origens: acidentes envolvendo o transporte de combustíveis por navios, caminhões ou dutos e principalmente devido a vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, os quais estão sujeitos a fortes processos corrosivos (SPILBORGHS, 1997).

Os postos de gasolina também compõem uma parte significativa do total dos empreendimentos, implantados nos centros urbanos, que representam potencialmente uma fonte de impacto ambiental caracterizada por vazamentos de derivados de petróleo no solo. Os problemas gerados pela contaminação do

solo e da água subterrânea por hidrocarbonetos são vários. Sanches (1998) aponta três problemas principais: existência de riscos à segurança das pessoas e das propriedades, riscos à saúde pública e dos ecossistemas e restrições ao desenvolvimento urbano e imobiliário. Segundo Gibotti (1999), a ocorrência de vazamentos de hidrocarbonetos configura perigo constante de incêndio ou explosão nos locais atingidos. Vapores de gasolina podem explodir sem ignição prévia ao atingirem concentrações da ordem de 14.000 ppm no ar, quando a mistura de combustível mais comburente é suficiente para que haja combustão espontânea. Além disso, alguns dos compostos orgânicos presentes na composição da gasolina e do óleo diesel são cientificamente comprovados como carcinogênicos. Dentre os BTEX o benzeno é considerado o mais tóxico, podendo em exposições crônicas causar danos à medula óssea, leucemia e câncer de fígado. O valor estimado da dosagem mínima letal (LDL) para humanos é de 194 mg.kg^{-1} (STOKSTAD, 2004).

Além destes problemas, é importante ressaltar que a recuperação de áreas contaminadas por métodos tradicionais é uma tarefa complexa e bastante demorada, e não se apresenta como um método efetivo, pois a contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, por exemplo, não promovem a degradação do petróleo. Outro fator complicador é o custo que, segundo artigo na Revista Meio Ambiente Industrial (n.40, p.94, 2003), pode variar entre R\$ 50 a 100 mil reais, um valor consideravelmente alto para o setor de revendedores de combustíveis. Os custos são dependentes do tipo de contaminante, das características do local e da amplitude da área.

Diante disso e devido a uma crescente preocupação e conscientização da sociedade em relação à qualidade ambiental, a população vem tornando-se mais crítica e participativa, exigindo atuações cada vez maiores das autoridades. Assim, vários recursos estão sendo disponibilizados para o desenvolvimento de novas tecnologias de remediação e limpeza. Uma das técnicas mais estudadas atualmente é a biorremediação.

No Brasil, a técnica de biorremediação ainda é pouco utilizada, porém, promissora se aplicada nas áreas contaminadas. Este é um método que pode ser aproveitado no mercado brasileiro, pois o país apresenta solos e temperaturas favoráveis.

3.3 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação consiste na utilização de grupos microbianos capazes de degradar hidrocarbonetos. Esses microrganismos possuem a capacidade de biotransformar moléculas poluentes em nutrientes para a realização de suas funções metabólicas e fisiológicas.

O objetivo da biorremediação é mineralizar os poluentes, liberando apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono e a água. A biorremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador. (PEREIRA e LEMOS, 2005).

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis). Hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. Compostos xenobióticos (compostos químicos fabricados pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação. Compostos ramificados e polinucleados são, geralmente, mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (ALEXANDER, 1965 *apud* ATLAS, 1986).

Porém o petróleo nunca é completamente degradado e sempre deixa algum resíduo complexo, que frequentemente apresenta-se como um piche preto contendo uma alta proporção de compostos asfálticos. Entretanto, possui baixa toxicidade e biodisponibilidade, tornando-se contaminantes inertes no meio ambiente (ATLAS, 1995).

Apesar de fundamentada em um único processo básico (biodegradação), as técnicas de biorremediação envolvem variações de tratamentos “in situ” (no local) e “ex situ” (fora do local) que podem envolver inúmeros procedimentos, os quais foram listados na tabela 1. A maioria dessas

estratégias se aplica aos tratamentos de superfície, enquanto algumas são específicas para a biorremediação em solos e água subterrânea como é o caso da bioventilação.

Tabela 1: Tipos e estratégias de biorremediação do solo

Biorremediação	Fundamentos e Definições
Passiva ou natural	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos organismos indígenas do solo.
Bioestimulação	Consiste na adição de nutrientes, como N e P, para estimular os microrganismos indígenas.
Bioventilação	É uma forma de bioestimulação por adição de gases estimulantes como O ₂ e CH ₄ , para aumentar a atividade microbiana decompositora.
Bioaugmentação	É a inoculação do local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
“Landfarming”	É a aplicação e incorporação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície do solo não contaminado para degradação.
Compostagem	É o uso de microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante.

Fonte: Moreira e Siqueira (2002)

Algumas técnicas de biorremediação podem ser utilizadas em todas as tecnologias, visando à otimização do processo de degradação dos poluentes pelos microrganismos. Dentre estas se destacam: a adição de nutrientes (bioestimulação) que aumenta a atividade microbiana nativa e a adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras (bioaugmentação) (RAIMUNDO e RIZZO, 2002).

3.3.1 Atenuação natural

A remediação natural é uma abordagem para a descontaminação tanto de solos, como de águas subterrâneas, que está ganhando aceitação, principalmente quando usada em locais contaminados por derramamento de derivados de petróleo, como é o caso dos postos de combustíveis.

Esse processo consiste na remediação de um poluente sem acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental, e pode ocorrer de maneira contínua devido ao processo de adaptação natural da microbiota nativa do solo impactado. Esses microrganismos passam então a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim uma redução da sua concentração ao longo do tempo. Além disso, o solo contaminado é sujeito ao processo de intemperização natural onde não só os processos biológicos estão envolvidos, mas também, processos físicos e químicos são responsáveis pela redução da concentração de poluente no solo (lixiviação, volatilização, etc.). No entanto, o tempo envolvido no processo de atenuação natural costuma ser bastante longo (meses ou anos) o que torna necessária, muitas das vezes a remoção do solo impactado e encaminhamento do mesmo para tratamento *ex-situ* (BAPTISTA e RIZZO, 2004).

3.3.2 Bioestimulação

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1995).

Esse processo é usado quando há a constatação de que existem microrganismos capazes de degradar compostos hidrocarbonados, no local da contaminação, e que estes não conseguem manter altas taxas de degradação devido a limitações físicas.

Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são: altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis. Uma variedade de métodos que modificam as condições ambientais podem ser utilizados para melhorar as taxas das atividades biodegradadoras da população microbiológica autóctone. Uma vez que as condições naturais limitantes são corrigidas, a distribuição natural existente de microrganismos permite, em muitos casos, um enriquecimento espontâneo de microrganismos apropriados (MARIANO, 2006).

3.3.3 Bioventilação

A técnica de *bioventing* ou bioaeração como é conhecida, caracteriza-se pela adição de oxigênio através do solo para estimular o crescimento dos organismos naturais e/ou introduzidos pela bioaugmentação.

É uma tecnologia promissora que aumenta a biodegradação natural de hidrocarbonetos de petróleo mediante fornecimento de oxigênio aos microrganismos existentes no solo. Este processo utiliza baixas vazões de ar, suficientes apenas para manter a atividade microbiana. Na maioria dos casos, o oxigênio é fornecido pela injeção direta de ar na massa de solo contaminado. (MENEGETTI, 2007)

Quase todos os hidrocarbonetos de petróleo são biodegradáveis sob condições aeróbicas. O oxigênio é um co-substrato que pode iniciar o mecanismo de biodegradação e, depois de iniciado o metabolismo, pode também funcionar como acceptor de elétrons para a geração de energia. Em altas concentrações de hidrocarboneto, a biodegradação aeróbia pode não ser suficiente para degrada-los completamente. Quando o oxigênio é esgotado e o nitrato está presente, os microrganismos anaeróbios facultativos utilizarão o nitrato como acceptor final de elétrons em substituição ao oxigênio (Borden et al., 1995).

A tecnologia de Bioventilação é um importante meio de remoção, através de volatilização, da massa do contaminante e sua destruição “in situ”. A aplicação de ar e/ou oxigênio puro, a camada de subsuperfície, estimula o crescimento da população existente, resultando na redução, via potencial oxidativo da microbiota, dos contaminantes do sítio (FERNANDES e ALCÂNTARA, 2003).

3.3.4 Bioaugmentação

A bioaugmentação envolve a inoculação do solo com culturas puras ou consórcio microbiano contendo microrganismos selecionados para degradação de contaminantes específicos. Esse processo tem sido estudado para vários herbicidas, hidrocarbonetos clorados e carbamatos através do emprego de populações nativas aclimatadas, isolados selecionados. Em geral, a

bioaumentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende aplicar a degradação acelerada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Segundo Sarkar et al. (2005), as culturas podem ser derivadas de um solo contaminado ou obtidas de uma cultura estoque que têm demonstrado, previamente, capacidade para degradar hidrocarbonetos.

3.4 DINÂMICA DOS COMPOSTOS DO ÓLEO BRUTO NO SOLO

As características físico-químicas dos combustíveis determinam seu comportamento e de seus constituintes no ambiente, ou seja, a mobilidade dos combustíveis é influenciada pelas propriedades físico-químicas dos hidrocarbonetos presentes, dentre as quais, as mais importantes são: solubilidade, pressão de vapor, densidade, viscosidade e o coeficiente de partição octanol-água. Este coeficiente é definido como a razão da concentração de um composto orgânico dissolvido entre o octanol e a água, em equilíbrio, o qual descreve a tendência de participação de um composto entre a fase orgânica e a fase aquosa. Assim, quanto maior for esta razão, maior será a hidrofobicidade do composto. (TROVÃO, 2006).

O escoamento dos hidrocarbonetos em meio saturado sempre é bifásico por serem compostos orgânicos que apresentam baixa miscibilidade em água. A fase composta pelos hidrocarbonetos recebe a denominação de NAPL (*non-aqueousphaseliquid*) ou fase líquida não aquosa. Esta por sua vez se divide em duas outras fases de acordo com a densidade dos hidrocarbonetos, são elas: LNAPL - *light non-aqueousphaseliquid*, ou fase líquida não aquosa mais leve que a água, que compreende os hidrocarbonetos associados com a produção, refino e distribuição de produtos do petróleo, por exemplo, a gasolina, o óleo diesel e o querosene; e DNAPL - *dense non-aqueousphaseliquid* ou fase líquida não aquosa mais densa que a água, a qual corresponde aos hidrocarbonetos utilizados nas atividades industriais, como hidrocarbonetos clorados, PCBs (bifenilaspolicloradas), antraceno, pireno entre outros (GUIGUER, 2000 apud MARIANO, 2006).

Nos casos de derramamentos em solo, primeiramente os combustíveis (LNAPL) tendem a migrar verticalmente, infiltrando no solo chamado de zona

não saturada, até atingir o lençol freático, denominado de zona saturada (FERREIRA, 2000). Conforme Guiguer (2000) *apud* Mariano (2006), esta infiltração é caracterizada pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração dos contaminantes: fase líquida residual, fase líquida livre, fase dissolvida e fase vapor. A formação das fases é controlada basicamente pelos fenômenos de dissolução, volatilização e adsorção. A fase líquida residual pode existir no solo como resíduos líquidos relativamente imóveis, adsorvidos ou retidos entre os sólidos do solo. O líquido livre não residual que passa pelo solo é chamado de fase líquida livre, que ao atingir o nível d'água subterrânea passa a flutuar sobre o mesmo. Já os hidrocarbonetos em fase dissolvida podem formar películas sobre a superfície do solo, ou mesmo plumas de contaminação quando atingem o nível d'água subterrânea. Porém, os hidrocarbonetos em fase de vapor podem ser volatilizados pelo vapor do solo, podendo também se condensar e adsorver-se na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo.

Segundo Ferreira (2000), a água de infiltração dissolve os componentes solúveis, como BTEX, pertencentes à LNAPL, e os transportam até a zona saturada, na forma de uma pluma que se distribui por difusão. Muitas das substâncias tendem a volatilizar, assim, o gás sofre partição de modo que uma parte fica retida no solo e outra migra para o ar, sendo transportados para outras partes do aquífero por difusão molecular. Os voláteis movem-se primeiramente pela zona saturada e finalmente entram na camada superficial do solo, onde, dependendo das condições físico-químicas retornam para a fase líquida por condensação.

Diferentemente dos compostos LNAPL, os DNAPL tendem a ocupar a parte mais profunda dos aquíferos quando o derrame é suficientemente grande. Porém, muitas substâncias decaem rapidamente ou são imobilizadas no solo de maneira que o número de compostos com persistência e mobilidade suficientes para deslocar-se até o lençol freático e contaminar as águas subterrâneas é relativamente pequeno (CETESB, 2008). Além de tóxicos os DNAPLs são muito difíceis de remediar com técnicas de remediação mais usuais.

Como os hidrocarbonetos usualmente se agregam aos componentes do solo, isto passa a ser um fator limitante a biodegradação dos poluentes. O

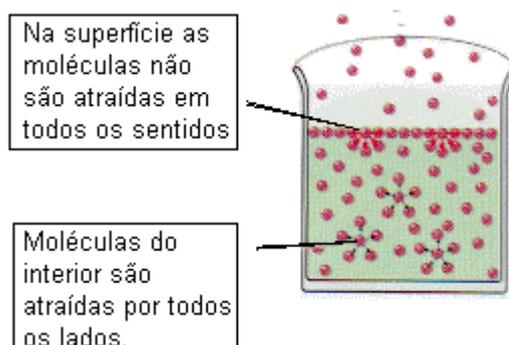
processo de biorremediação depende da capacidade de assimilação dos compostos pelos microrganismos, e se estes passam a ter disponibilidade limitada, ocorrerá dificuldade na sua degradação. Desta forma, há a necessidade da utilização de substâncias que aumentem a disponibilidade desses poluentes à população microbiana, os surfactantes que tem a capacidade de reduzir a tensão superficial água/óleo aumentando sua solubilidade.

3.5 TENSÃO SUPERFICIAL

A tensão superficial são as forças coesivas entres as moléculas de um líquido, pois estes tendem a adotar uma forma que minimize sua área de superfície, na tentativa de manter as moléculas com um maior número possível de vizinhos semelhantes. As moléculas na superfície não têm outras moléculas iguais na sua vizinhança e conseqüentemente sofrem uma coesão mais forte com aquelas diretamente associadas.

As forças coesivas entre as moléculas no interior do líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. Aquelas da superfície não têm átomos vizinhos acima delas, e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado de tensão superficial, como pode ser observado no esquema ilustrativo na figura 1.

Figura 1: Esquema ilustrativo das forças intermoleculares.



Fonte: <http://dc136.4shared.com/doc/4qBTP2KI/preview.html>

3.6 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos formados por moléculas que possuem uma parte hidrofóbica e uma hidrofílica, que tendem à separação preferencialmente na interface entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tais como interfases óleo/água ou ar/água. Atuam nas tensões superficial e interfacial e formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água e vice versa. A eficácia dos surfactantes é determinada através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 1978 apud MULLIGAN, 2005).

Desta forma, os surfactantes são uma ampla classe de moléculas anfipáticas (com domínio polar e apolar) que apresentam uma grande variedade de aplicações, tanto industriais como na limpeza de locais contaminados com hidrocarbonetos. Contudo, surfactantes sintéticos mostram alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e eficiência somente em faixas pequenas de pH e temperatura.

3.7 BIOSSURFACTANTES

Devido a essas limitações dos surfactantes sintéticos, o interesse pelos biossurfactantes (surfactantes de origem microbiana), produzido por certas bactérias, leveduras e fungos, tem aumentado devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos e seu papel na recuperação de ecossistemas pela aceleração da biodegradação dos hidrocarbonetos provenientes de vazamentos. Além disso, alguns biossurfactantes apresentam capacidades anti-fúngicas, anti-virais e de sorção de metais e são usados na indústria do petróleo para aumentar a recuperação do petróleo (OLIVEIRA et al., 2005; PRUTHI e CAMEOTRA, 1997).

Os biossurfactantes apresentam as mesmas características dos surfactantes químicos, reduzem as tensões interfacial e superficial, tanto em

soluções aquosas quanto em misturas de hidrocarbonetos. Possuem uma estrutura comum, a qual a porção hidrofílica pode ser composta de aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, enquanto a porção hidrofóbica é constituída de uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, saturados ou insaturados (DESAI e BANAT, 1997).

São muitas as vantagens apresentadas pelo biossurfactante quando comparado aos de origem sintética, tais como (KOSARIC, 2001):

- Alta biodegradabilidade;
- Baixa toxicidade;
- Biocompatibilidade e biodigestividade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos;
- Possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais;
- Especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos;
- Uso em biorremediação de locais impactados por óleo e biodegradação e detoxificação de efluentes industriais;
- Eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

Os biossurfactantes, ao serem excretados durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e a translocação de substratos insolúveis através da membrana celular. Estes biotensoativos podem ser encontrados como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas, ou ficarem aderidos à superfície dessas células com a função de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade das substâncias hidrofóbicas (MARIANO et al., 2007; CAMEOTRA & SINGH, 2009).

3.8 PRINCIPAIS BIOSSURFACTANTES E OS MICRORGANISMOS PRODUTORES

Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes incluem: glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos ou lipoproteínas (DESAI e DESAI, 1993).

Essas classes e seus microrganismos produtores correspondente estão distribuídos entre uma extensa variedade de gêneros, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
• Ramnolipídeos	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>
• Soforolipídeos	<i>Torulopsisbombicola</i> , <i>T. apícola</i>
• Trealolipídeos	<i>Rhodococcuserythropolis</i> , <i>Mycobacterium SP</i>
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	
• peptídeo-lipídeo	<i>Bacilluslicheniformis</i>
• viscosina	<i>Pseudomonasfluorescens</i>
• serrawetina	<i>Serratiamarcescens</i>
• surfactina	<i>Bacillussubtilis</i>
• subtilisina	<i>Bacillussubtilis</i>
• gramicidina	<i>Bacillusbrevis</i>
• polimixina	<i>Bacilluspolymyxa</i>
Ácidos graxos, Lipídeos neutros e Fosfolipídeos	
• ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
• lipídeos neutros	<i>Nocardiaerythropolis</i>
• fosfolipídeos	<i>Thiobacillusthiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
• emulsan	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
• biodispersan	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
• liposan	<i>Candidalipolytica</i>
• carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonasfluorescens</i>
• manana-lipídeo-proteína	<i>Candidatropicalis</i>
Surfactantes particulados	
• vesículas	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
• células	Várias bactérias

Fonte: DESAI e BANAT (1997)

Dentre esses, os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. são extensamente estudados.

3.9 *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

A *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, pode ser isolada de diferentes habitats incluindo a água, o solo e plantas, é um patógeno oportunista humano que causa infecções nosocomial sérias e também é resistente a antibióticos. Sob condições ambientais específicas esta bactéria produz um biossurfactante contendo ramnose – glicolípido. O tipo e a proporção do ramnolípido produzido dependem da cepa, da fonte de carbono utilizada e das condições de cultivo. (FONTES et al., 2008)

A cultura de *Pseudomonas* produz primeiramente duas formas de ramnolídeos: ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolípido) e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (di-ramnolípido) (Sánchez et al., 2007).

3.10 RAMNOLIPÍDEOS

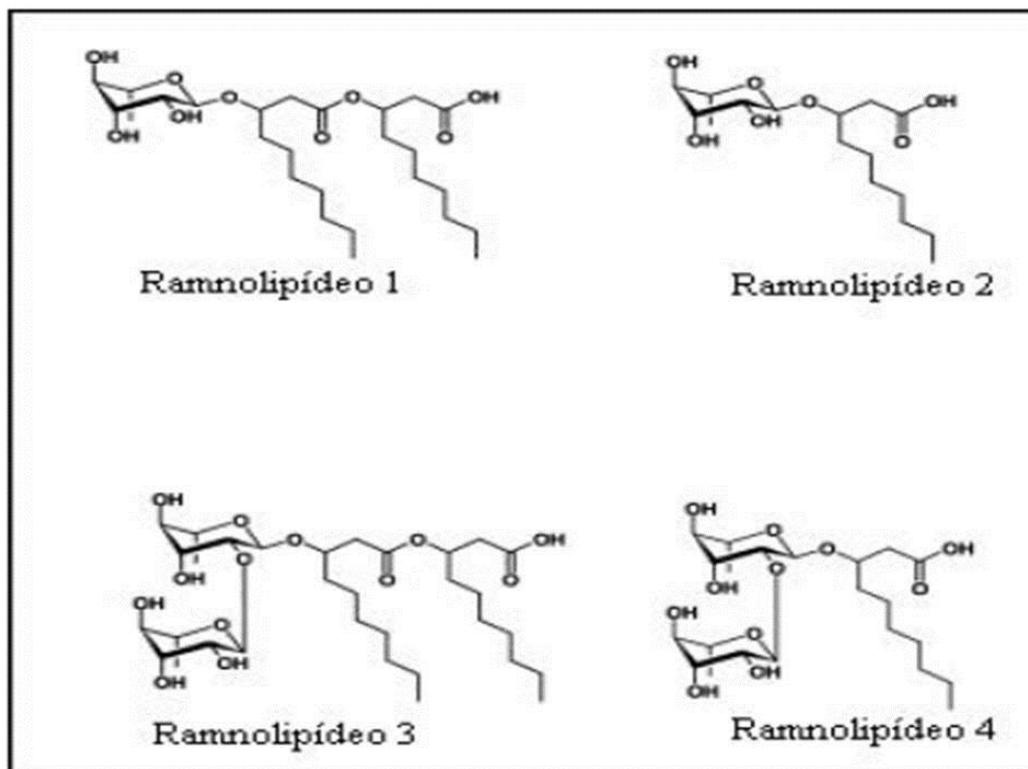
Os ramnolídeos constituem uma das classes mais interessantes dos biossurfactantes por causa de suas características vantajosas. Com respeito a sua produção, mostram rendimentos elevados em comparação a outros biossurfactantes, bem como diversos materiais renováveis, tais como óleos ou resíduos da indústria de alimento, podem ser usados como fontes do carbono (Sánchez et al., 2007).

Diferentes tipos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produzem diversos homólogos estruturais de ramnolídeos. O tipo de ramnolípido produzido depende da cepa bacteriana, da fonte do carbono usada, e da estratégia do processo (Lang &Wullbrandt, 1999).

Os principais glicolídeos produzidos por *P. aeruginosa* são os ramnolídeos dos tipos 1 e 2, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, respectivamente. A formação de ramnolídeos 3 e 4, contendo uma molécula de ácido β -hidroxidecanóico e uma ou duas unidades de ramnose, respectivamente, metil-ésteres derivados dos ramnolídeos 1 e 2 e ramnolídeos com outras cadeias de ácidos graxos também já foram

previamente reportadas (Kronemberger et al., 2007). Abaixo, na figura 2, pode ser observado as estruturas dos 4 tipos de ramnolipídeos.

Figura 2: Estrutura dos ramnolipídeos 1-4



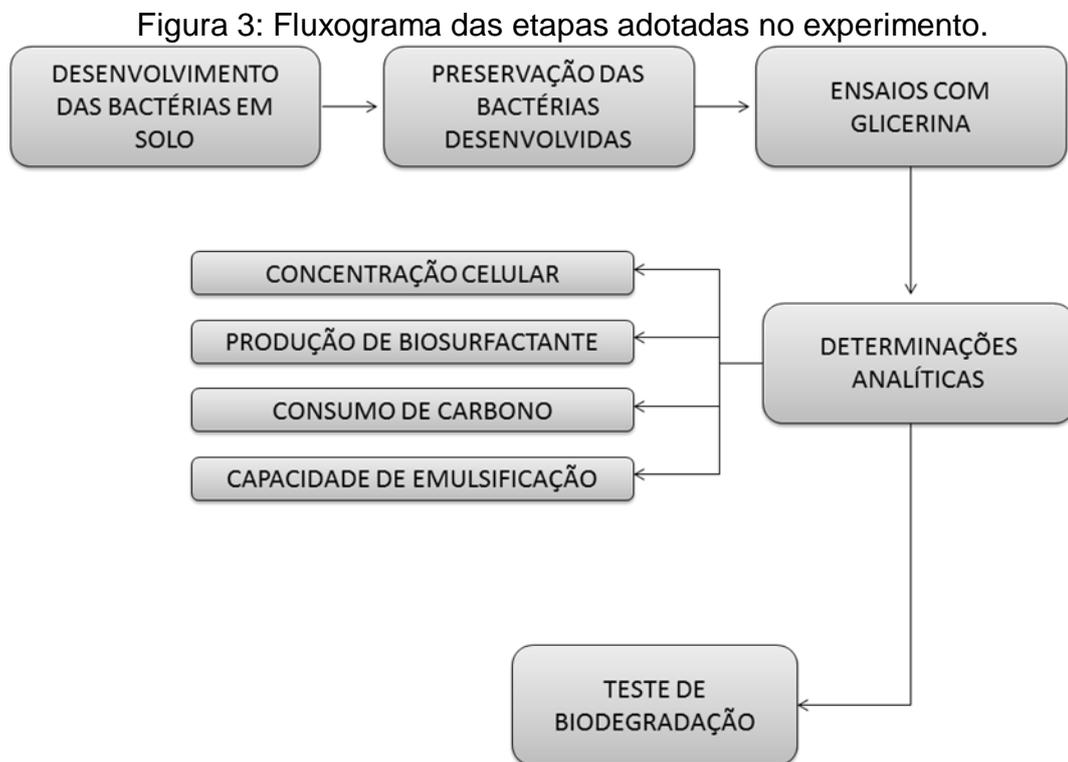
FONTE: TUMMELER, EFFENBERGER E SYLDATK (2003)

Os ramnolipídeos consistem de uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, com 8-12 átomos de carbono, que podem ser saturados ou insaturados (SIM et al., 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

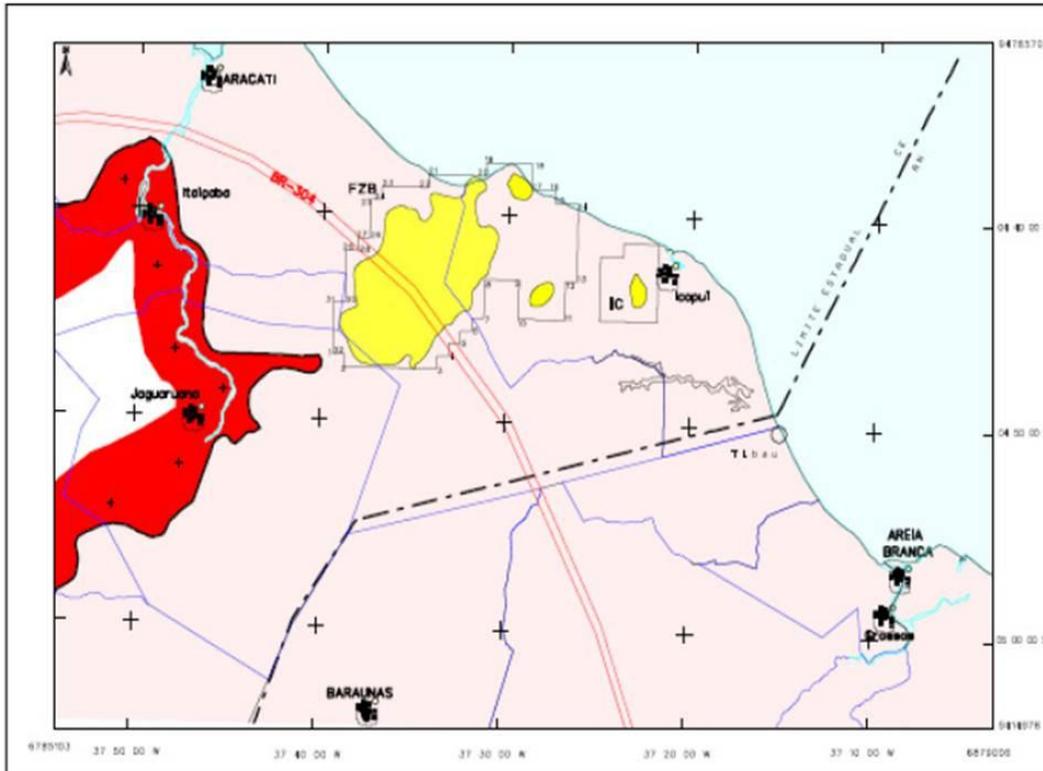
Neste capítulo serão apresentadas as técnicas e os materiais utilizados para a realização de cada etapa do estudo. Inicialmente será apresentado o processo utilizado para o desenvolvimento e preservação das bactérias, em seguida como foi realizado o ensaio para determinação do crescimento e produção de biossurfactante, especificando o procedimento adotado para a sua quantificação, e por fim o ensaio de biorremediação das amostras de solo contaminados. Todas as técnicas descritas foram realizadas no Laboratório de Engenharia Ambiental e Controle de Qualidade (LEACQ – DEQ/UFRN).

A figura 3 abaixo mostra o fluxograma simplificado das etapas realizadas no estudo.



A amostra de petróleo utilizada foi coletada no campo de Fazenda Belém que localiza-se na porção noroeste da Bacia Potiguar emersa, leste do Estado do Ceará, nos municípios de Aracati, Icapuí e Jaguarana, cerca de 160 km a sudeste de Fortaleza e 28 km a sudeste da cidade de Aracati, como mostrado no mapa representado na figura 4. A acumulação principal do campo ocupa uma área de 143,68 km² e a área da concessão abrange 307,512 km².

Figura 4: Mapa de localização do Campo de Fazenda Belém



4.1 DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS EM SOLO

Sabendo que o solo é um dos habitats natural de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizou-se 1,5 kg de areia, a qual foi acondicionada em bandejas plásticas, como mostrado na figura 5, e enriquecida com uma solução petróleo/diesel de 2,5 g/L, de modo que ficassem com uma concentração de 2% v/m. O solo também foi umedecido com uma solução nutritiva com a seguinte composição: KH_2PO_4 0,36 mg/L; MgSO_4 0,120 mg/L; CaCl_2 0,110 mg/L; NH_4NO_3 0,080 mg/L e MgNO_3 0,086 mg/L; também foi utilizada uma concentração de 2% v/m.

Durante 25 dias foi promovido, em intervalos regulares de cinco dias, a aeração e a exposição ao sol das bandejas que continham o solo. Nesse período, também eram recolhidas amostras que foram submetidas a análises bacteriológicas para identificação e quantificação do gênero *Pseudomonas*.

Figura 5: Solo contaminado com areia para desenvolvimento das bactérias.



4.2 ANÁLISE DO SOLO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Utilizando erlenmeyers de 125 mL, amostras de 1 g de areia foram diluídas em 100 mL de água destilada. Esse sistema foi submetido à agitação de 200 rpm por 24 horas para que haja o máximo de contato do solo com a água, possibilitando, assim, a transferência dos microrganismos para a água. O mecanismo utilizado pode ser observado na figura 6 abaixo.

Figura 6: Mecanismo para transferência das bactérias da areia para água.



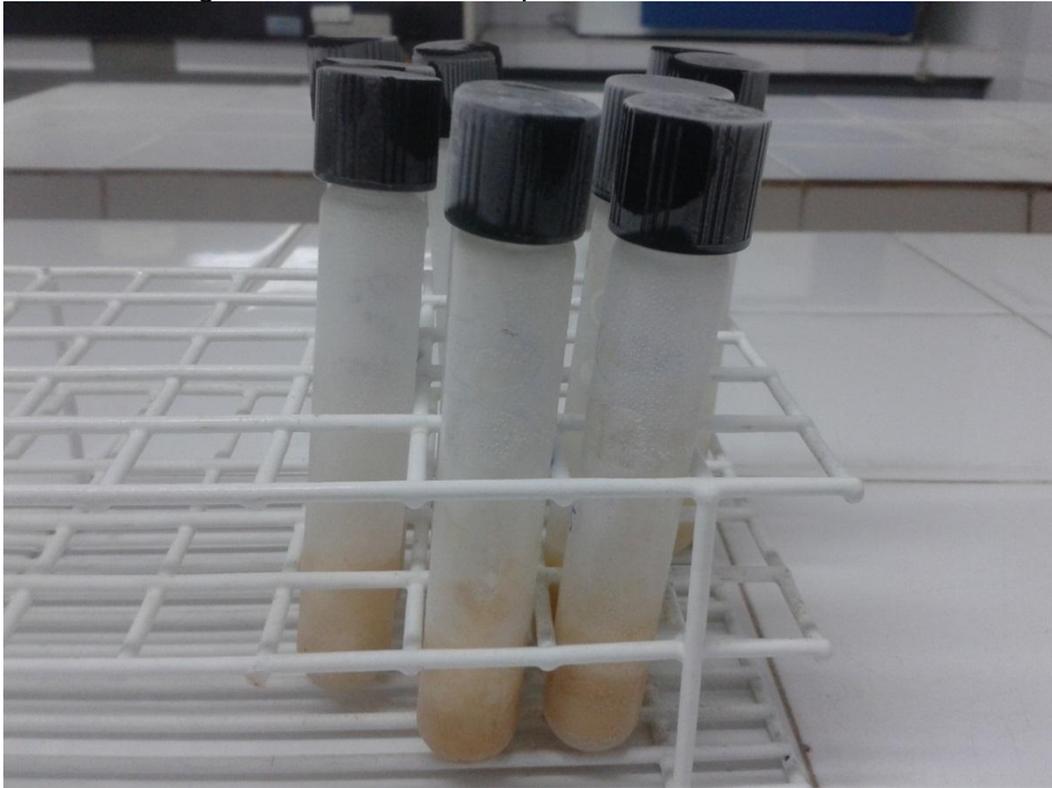
Após as 24 horas realizaram-se diluições em série das amostras, de modo a permitir a inoculação no meio qualitativo Acetamide Agar e no quantitativo Cetrimide Agar, ambos meios seletivos para as *Pseudomonas aeruginosas*. Os inóculos permaneceram por dois dias em uma estufa regulada em 35 °C, conforme especificações do meio.

Posteriormente foi realizada a contagem das colônias que se desenvolveram durante o período de inoculação.

4.3 PRESERVAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As colônias que se desenvolveram, após serem quantificadas, foram repicadas e transferidas para o meio skin milk, concentração de 15% em massa, como mostrado na figura 7, onde foram preservadas a uma temperatura de -10 °C de modo a permitir sua posterior utilização.

Figura 7: *Pseudomonas* preservadas em skin milk.



4.4 DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS PRESERVADAS

As bactérias que mostraram melhor adaptação ao solo contaminado com óleo bruto foram utilizadas para a análise do seu crescimento e da produção do biossurfactante.

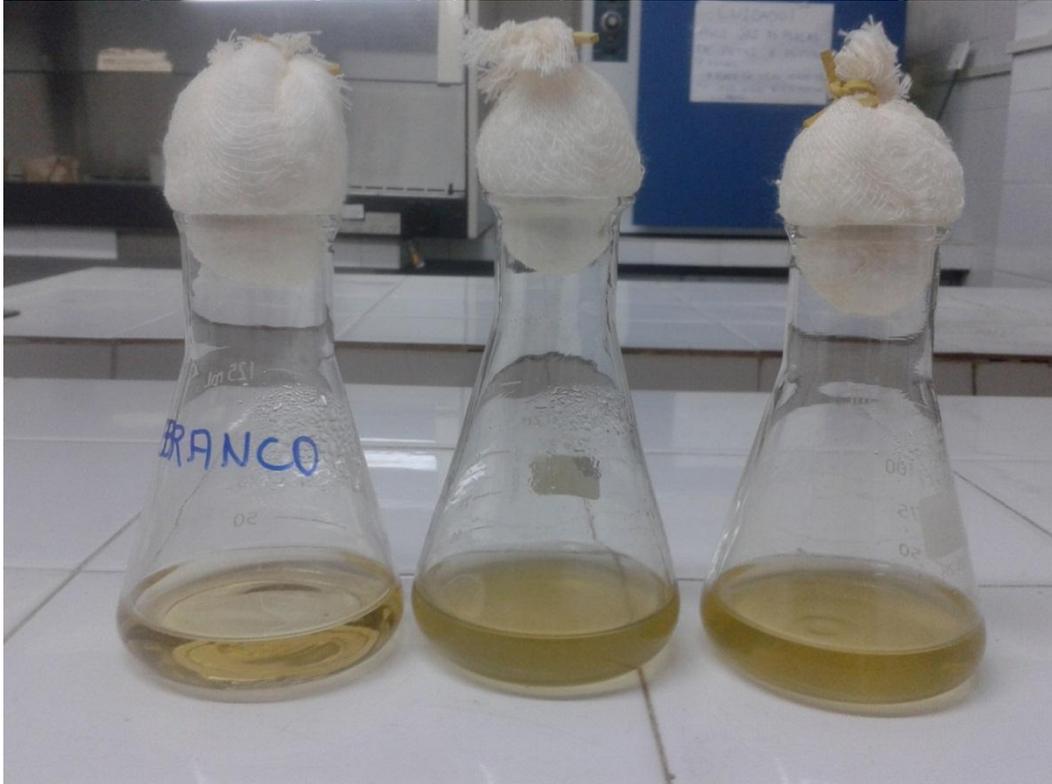
Desta forma, as bactérias presentes no skin milk foram transferidas para placas petri contendo o meio nutriente Count Plante Agar e colocadas na estufa regulada com uma temperatura de 30 °C durante 48 horas, para o seu completo desenvolvimento.

4.5 ENSAIO PARA ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

As colônias desenvolvidas foram repicadas e transferidas para um pré-inóculo com uma solução nutriente de peptona 2% em massa, onde

permaneceram no shaker em agitação de 200 rpm e 30 °C durante 24 horas. Após essa etapa, as bactérias já estavam preparadas para os ensaios. A figura 8 abaixo mostra a mudança de cor da solução inicial, indicando a produção de biomassa.

Figura 8: Solução de peptona após 24 horas de incubação.



Utilizou-se como meio líquido para a avaliação da produção de biossurfactante e do crescimento celular, o meio mineral descrito por Robert et al., 1989, cuja composição pode ser encontrada na tabela 3 abaixo. Como fonte de carbono utilizou-se a glicerina.

Tabela 3: Composição do meio mineral

Composto	Concentração (g/L)
NaNO ₃	7,0
KCl	0,1
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Extrato de levedura	0,1

Fonte: ROBERT et al., (1989)

Após ajuste de pH para 7,0 com NaOH ou HCL 1N, quando necessário, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Nos ensaios empregou-se a glicerina com concentrações de 2 e 10%. Todos os experimentos foram incubados em mesa agitadora, a 30°C e 200 rpm. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL, contendo um volume final de 50 mL de meio de cultivo. Os recipientes foram inoculados com 2% da suspensão celular das *Pseudomonas*, obtida do cultivo da solução de peptona, e mantidos durante 13 dias (312 horas) a 200 rpm e 30°C no shaker, como mostrado na figura 9.

Figura 9: Ensaios com glicerina.



As amostras foram retiradas a cada 24 horas e de duas em duas horas, durante as oito primeiras horas, para análise de crescimento celular, produção de ramnose e consumo de carbono. As medidas da tensão superficial foram realizadas no meio de cultivo inicial (tempo zero) e ao final de cada ensaio (após 312 horas).

4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.6.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada através da massa seca. Para tanto, amostras do meio fermentado foram centrifugadas a 3500 rpm por 40 minutos. As células precipitadas foram lavadas e centrifugadas por mais duas vezes em água destilada. Após a última centrifugação, as células foram suspensas em água destilada e transferidas para cápsulas de porcelana previamente taradas e levadas à estufa a 80 °C por 24 horas. A determinação da massa seca foi feita pela diferença dos pesos final e inicial das cápsulas.

4.6.2 Determinação da concentração de biossurfactante

A produção do ramnolípido foi quantificada colorimetricamente em termos de concentração de ramnose produzida no meio de cultivo, através da análise de 6-deoxihexose (CHANDRASEKARAM e BEMILLER, 1980).

Preparo dos reagentes:

Solução A:

- 90 mL de H₂SO₄
- 15 mL de água destilada

Esta solução pode ser preparada anteriormente e estocada em frasco âmbar.

Solução B:

- 0,2 mL de ácido tioglicólico
- 5,8 mL de água destilada

Esta solução deve ser preparada apenas no momento de uso.

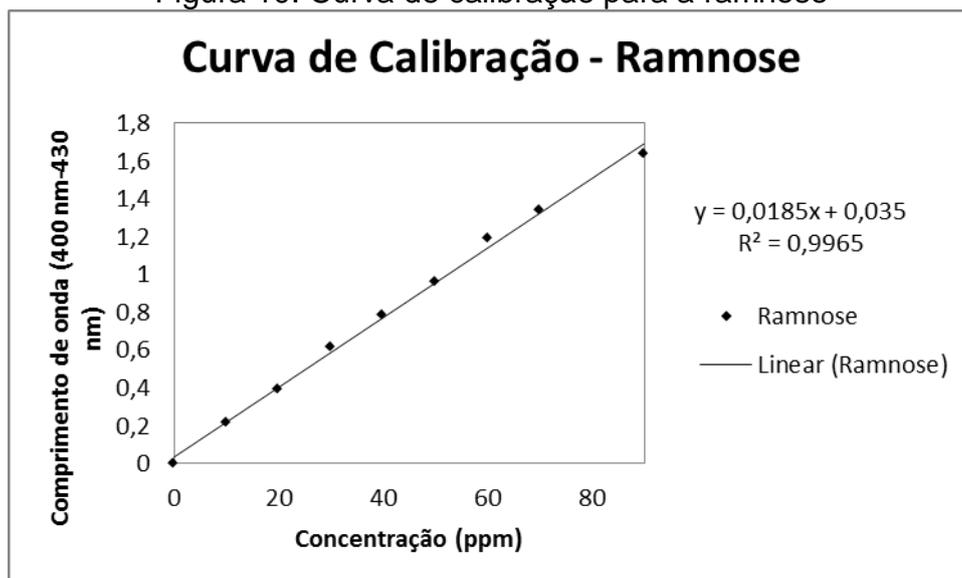
O procedimento consiste em, no tubo de ensaio, adicionar 1mL da amostra contendo ramnose juntamente com 4,5 mL da solução A e incubar por 10 minutos a 100°C. Após a solução ter resfriado a temperatura ambiente, adicionar 0,1 mL da solução B, homogeneizar os tubos e guardar em local com ausência de luz por três horas. Passado esse tempo, deve-se realizar a leitura de absorvância a $\lambda = 400 \text{ nm}$ e $\lambda = 430 \text{ nm}$ no espectrofotômetro UV visível.

Antes de realizar a leitura das amostras, foi preparada uma curva padrão de ramnose, a partir de uma solução inicial de ramnose comercial 100 mg/L. Esta solução foi diluída em concentrações de 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 e 90 mg/L. Aplicou-se o procedimento citado acima para cada uma das diluições e foi realizada a leitura da absorvância ($\lambda = 400 \text{ nm}$ e $\lambda = 430 \text{ nm}$) das mesmas. A leitura em $\lambda = 430 \text{ nm}$ indica a interferência de outros açúcares.

Com os resultados, subtraiu-se o valor obtido na leitura a $\lambda = 430 \text{ nm}$ do obtido na leitura a $\lambda = 400 \text{ nm}$, para se obter o valor da absorvância final. A figura 10 abaixo apresenta a curva padrão de ramnose, a partir da qual se obteve a seguinte expressão:

$$[] \text{ de ramnose} = \left(\frac{\text{Absorvância final} - 0,0355}{0,0185} \right) * \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Figura 10: Curva de calibração para a ramnose



Para a determinação da concentração de ramnose das amostras retiradas, 20 mL de cada amostra foram centrifugados por 40 minutos a 3500 rpm, separou-se o sobrenadante e a partir deste realizou-se o mesmo procedimento citado anteriormente. A equação foi utilizada para a conversão dos dados de absorbância à concentração equivalente.

4.6.3 Determinação da concentração de carbono

A concentração de carbono no meio fermentado foi determinada pelo DQO (Demanda Química de Oxigênio), segundo *Standard methods* (ALPHA, 1998). O método baseia-se na oxidação química da material orgânica, obtida através de um oxidante forte, o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido e elevada temperatura.

Preparo dos reagentes:

Solução digestora:

- 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$ previamente seco a $150^\circ C$ por 2 horas
- 500 mL de água destilada
- 167 mL de H_2SO_4 concentrado
- 33,3 g de $HgSO_4$

Depois de dissolvida, a solução deve ser resfriada a temperatura ambiente e diluída para 1000 mL.

Solução de ácido sulfúrico:

- Adicionar Ag_2SO_4 em H_2SO_4 concentrado na razão de 5,5 g Ag_2SO_4/kg H_2SO_4
- Deixar repousar por 1 ou 2 dias pra dissolver e misturar

O procedimento consiste em, nos tubos de digestão, adicionar 2,5 mL da amostra a ser analisada, 1,5 mL da solução digestora e 3,5 mL da solução de ácido sulfúrico. Feito isto, deve-se colocar os tubos para aquecer durante 2 horas a $150^\circ C$ no digestor. E após ocorrer o resfriamento das amostras a temperatura ambiente, estas devem ser colocadas no espectrofotômetro UV visível no comprimento de onda 600 nm, para leitura da absorbância.

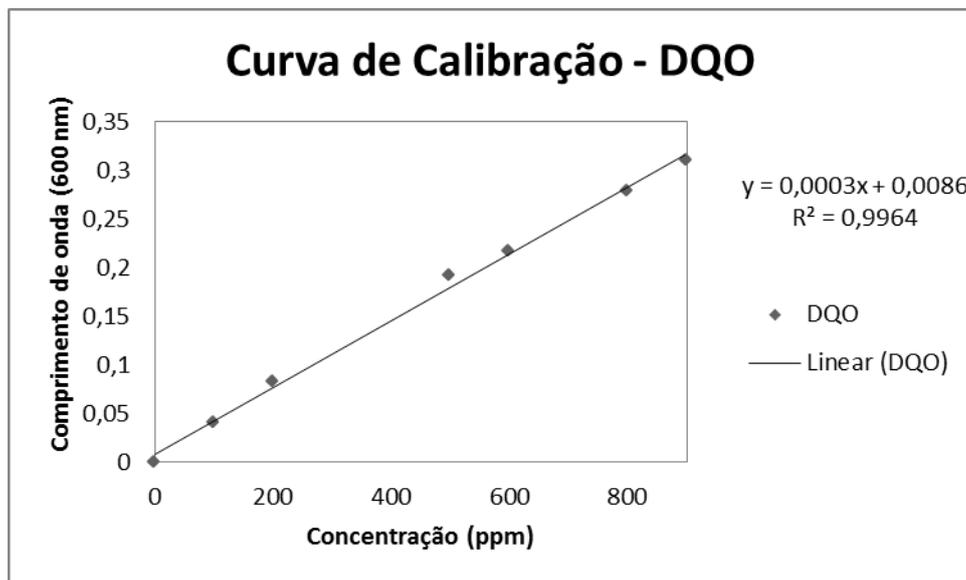
Antes de realizar a leitura das amostras, foi preparada uma curva padrão de bifitalato de potássio, a partir de uma solução inicial de $C_8H_5KO_4$ 1000mg/L.

Esta solução foi diluída em concentrações de 100; 200; 500; 600; 800 e 900 mg/L. Aplicou-se o procedimento citado acima para cada uma das diluições e foi realizada a leitura da absorbância ($\lambda = 600 \text{ nm}$) das mesmas.

A figura 11 abaixo apresenta a curva padrão para a análise de DQO, com a qual se obteve a equação (2) abaixo:

$$[] \text{mg } O_2/L = \left(\frac{\text{Absorbância final} - 0,0086}{0,0003} \right) * \text{fator de diluição} \quad (2)$$

Figura 11: Curva de calibração para DQO



Com os resultados obtidos ainda deve-se calcular o valor real da DQO a partir da seguinte equação (3) abaixo:

$$DQO \text{ em } mg \text{ } O_2/L = \frac{mg \text{ } O_2 \text{ em volume final} * 1000}{mL \text{ da amostra}} \quad (3)$$

Para a determinação da DQO das amostras retiradas, 20 mL de cada amostra foram centrifugados por 40 minutos a 3500 rpm, separou-se o sobrenadante e a partir deste realizou-se o mesmo procedimento citado anteriormente. E as equações foram utilizadas para a conversão dos dados de absorbância à demanda química de oxigênio equivalente.

4.6.4 Determinação do índice de emulsificação (E24)

A estabilidade das emulsões formadas pelo biossurfactante foi avaliada contra diferentes fontes hidrofóbicas. As análises foram realizadas em temperatura ambiente e o índice de emulsificação foi determinado segundo IQBAL et. Al., 1995. O método consiste na adição do hidrocarboneto no caldo livre de células (2mL de cada) e sua posterior agitação em alta velocidade por 2 minutos. Após 24 horas de repouso, o índice de emulsificação pode ser calculado através da equação (4):

$$E24 = \left(\frac{\text{altura da camada de emulsão}}{\text{altura total}} \right) \times 100 \quad (4)$$

4.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O TESTE DE BIODEGRADAÇÃO

O teste de acompanhamento do processo de biodegradação foi realizado em microcosmos, como mostrado na figura 12, semelhantes aos utilizados na etapa de desenvolvimento das bactérias em solo. Para isso, contaminou-se manualmente quatro amostras de solo (2 kg cada), sendo duas delas com óleo bruto e as outras duas com diesel, de forma a se obter uma concentração de 2,5% p/p.

Figura 12: Microcosmos utilizados para o ensaio de biorremediação. A) Contaminado com óleo bruto B) Contaminado com diesel.



Para cada tipo de contaminante, foi produzido um branco, ou seja, não ocorria adição da cepa da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, e o outro sofria a bioaumentação com uma suspensão celular, de forma a se obter uma concentração de 2,5% p/p.

A amostragem dos solos, para quantificação de óleos e graxas, ocorreu em intervalos de 10 dias. No dia em que ocorria a retirada de amostras, realizava-se uma pequena homogeneização do conteúdo das bandejas, o que também favorecia a aeração do meio.

4.7.1 Preparo da suspensão celular

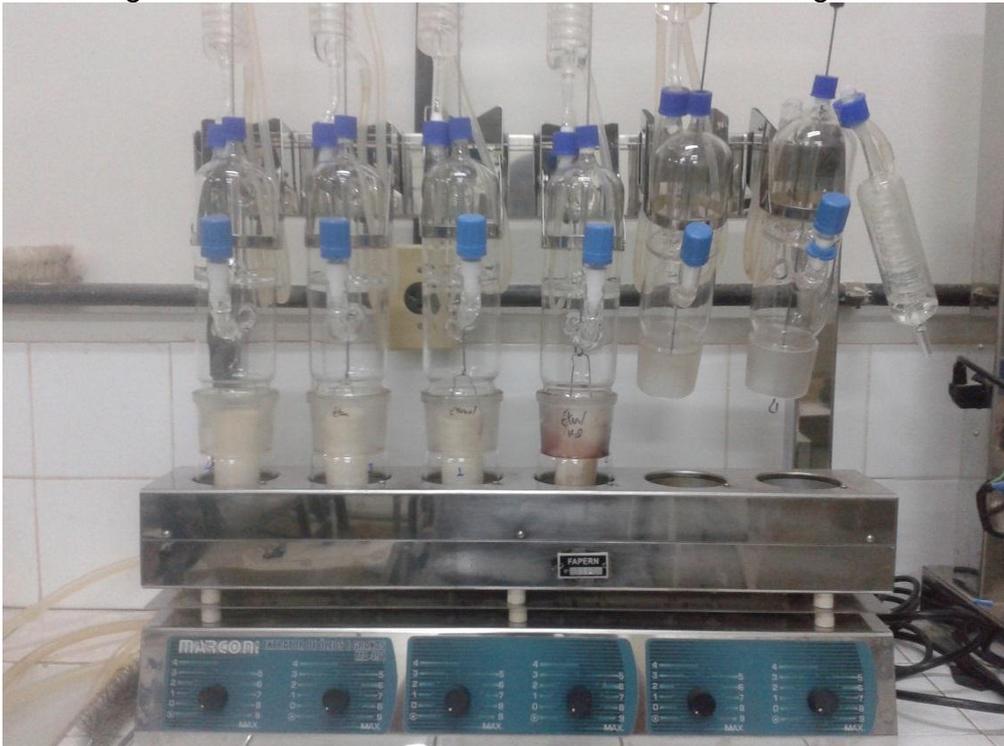
Para o preparo da suspensão celular foram repicadas de placas petri colônias desenvolvidas e transferidas para uma solução nutriente de peptona 2% em massa, a qual permaneceu no shaker em agitação de 200 rpm e 30 °C durante 24 horas. Passado esse tempo, a solução foi diluída na proporção 1:10 antes de ser adicionada ao microcosmo.

Para quantificação da quantidade de proteína celular adicionada ao microcosmo, foi utilizado o método da massa seca. E em cada bandeja foi acrescentada 50 mL da suspensão com uma concentração de 2g/L.

4.7.2 Análise de óleos e graxas

O teor de óleos e graxas (hidrocarbonetos) no solo durante o processo de biorremediação foi quantificado por método de extração contínua em aparelho tipo Soxhlet (Extrator de Óleos e Graxas Marconi MA-491), como mostrado na figura 13, baseado na quantificação gravimétrica do material extraído com solvente. O método baseia-se na solubilidade dos hidrocarbonetos em um solvente orgânico (hexano).

Figura 13: Extrator utilizado na análise de óleos e graxas.



A análise ocorreu em amostras de cinco gramas do solo contaminado. Após o processo de extração, o extrato orgânico foi concentrado na estufa durante 1 hora a uma temperatura de 80°C.

O percentual de óleos e graxas (O&G) presentes no solo e o percentual de remoção foram calculados pelas equações (5) e (6) abaixo:

$$\%O\&G = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{amostra}}} * 100 \quad (5)$$

e

$$\%RO\&G = \left(1 - \left(\frac{C_f}{C_i} \right) \right) * 100 \quad (6)$$

Onde:

O&G – óleos e graxas;

m – massa;

RO&G – remoção de óleos e graxas;

C_f – percentual de óleos e graxas da amostra no tempo final de biorremediação;

C_i – percentual de óleos e graxas da amostra no tempo inicial de biorremediação.

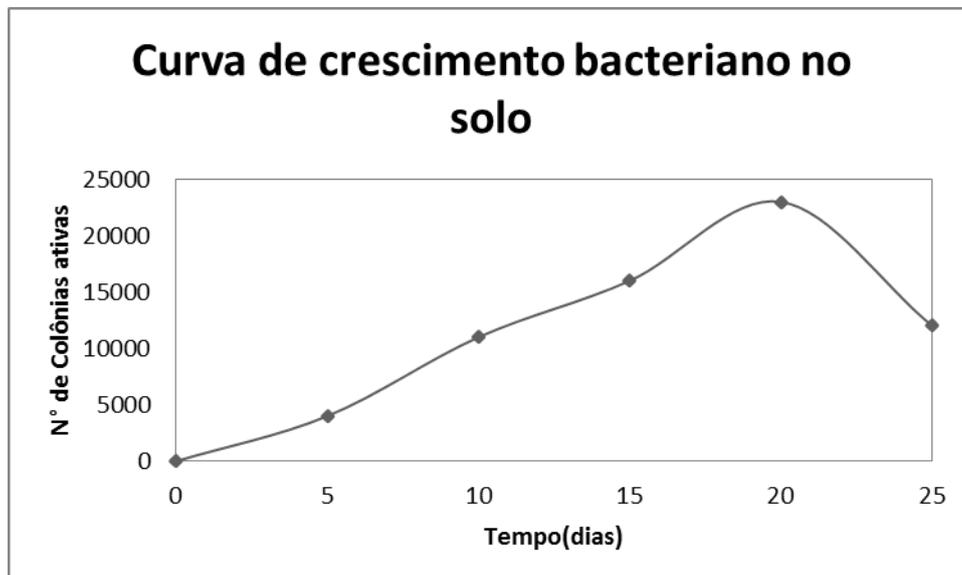
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são discutidos os resultados obtidos por cada uma das técnicas aplicadas na pesquisa. Inicialmente serão apresentados os resultados para o desenvolvimento das bactérias do tipo *Pseudomona aeruginosa* no solo, em seguida os resultados para os ensaios em meio líquido com glicerina e por fim os resultados obtidos no teste de biorremediação.

5.1 RESULTADO DO DESENVOLVIMENTO DAS PSEUDOMONAS EM SOLO

Durante 25 dias foi analisado, tanto quantitativamente como qualitativamente, a presença de bactérias do tipo *Pseudomona aeruginosa* em solo contaminado manualmente. O resultado pode ser observado na figura 14 abaixo.

Figura 14: Quantificação das bactérias em solo



Pode-se observar que ocorreu um crescimento da quantidade de colônias ativas até o vigésimo dia. Portanto, apenas durante o período de desenvolvimento das bactérias é que as colônias foram repicadas e preservadas em meio skin milk.

5.2 ENSAIO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS BACTÉRIAS

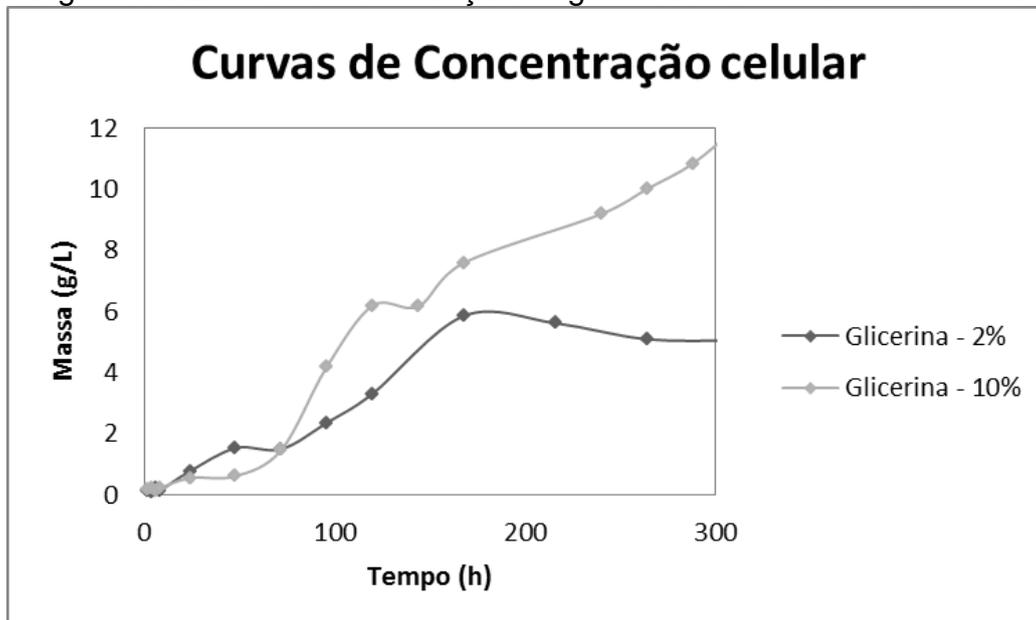
A seguir estão os resultados obtidos no desenvolvimento da bactéria, utilizando como fonte de carbono a glicerina em concentrações de 2 e 10%. Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar o crescimento microbiano, a produção de biossurfactante e o consumo de carbono.

Foram utilizadas duas concentrações da fonte de carbono, visando descobrir a cinética de crescimento e o comportamento da bactéria a baixas concentrações de carbono.

5.2.1 CRESCIMENTO CELULAR

Após a inoculação realizada no meio de cultura favorável ao seu desenvolvimento, sob temperatura controlada e agitação adequada, observou-se um comportamento nos valores da concentração celular, conforme indicado na figura 15 abaixo.

Figura 15: Efeito da concentração de glicerina no crescimento celular.

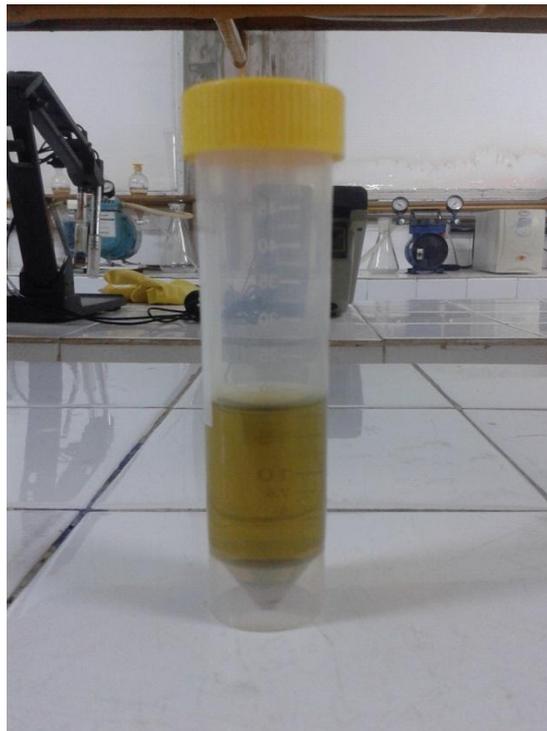


Nas primeiras horas de cultivo, para os dois ensaios foram observados uma fase *lag* de adaptação, tratando-se de um período o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio.

A partir da figura 15 acima, observa-se que a menor concentração de glicerina proporcionou um desenvolvimento celular máximo de 5,865 g/L após 168 horas de cultivo. Após esse tempo, ocorreu uma estabilização nos valores, indicando um provável esgotamento da fonte de carbono disponível para o consumo microbiano. Este evento não foi observado quando se utilizou uma concentração 10% de glicerina.

No segundo ensaio, ou seja, aquele que apresentava a maior concentração de glicerina foi necessário um tempo maior de adaptação. Porém, ao final do tempo de cultivo a bactéria ainda encontrava-se na fase logarítmica de crescimento, indicando que não houve nenhum tipo de inibição para o crescimento celular e que ainda havia carbono disponível para o consumo. O caldo de cultivo apresentou turbidez e mudança de cor, indicando a formação de biomassa e de produtos, como observado na figura 16.

Figura 16: Meio de cultivo com 10% de glicerina inoculada (312 horas de incubação)



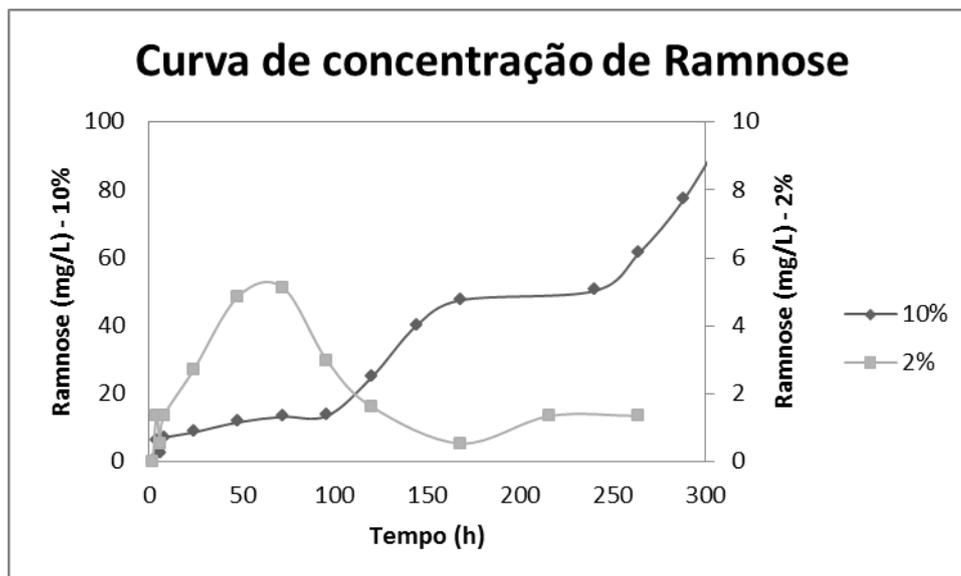
5.2.2 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE

Ao analisar a produção de biosurfactante durante o crescimento em glicerina, nas duas concentrações estudadas, observou-se uma baixa produção

do tensoativo em baixas concentrações de carbono. Utilizando a concentração 2% de glicerina houve um pico de 5,14 mg/L no tempo de 72 horas, seguido pelo decaimento da sua concentração, o que pode indicar um provável consumo do produto por parte da bactéria quando o substrato passou a ter concentrações reduzidas.

Como se pode observar na figura 17 abaixo, diferente do que ocorreu quando foi empregada uma baixa concentração de carbono, o aumento da concentração do substrato permitiu uma elevada produção do biossurfactante, que atingiu um valor de 98,87 mg/L ao final do tempo de fermentação. Porém, esta ainda encontrava-se em fase de aumento da concentração, indicando que, caso a fermentação continuasse, poderia se conseguir valores mais elevados.

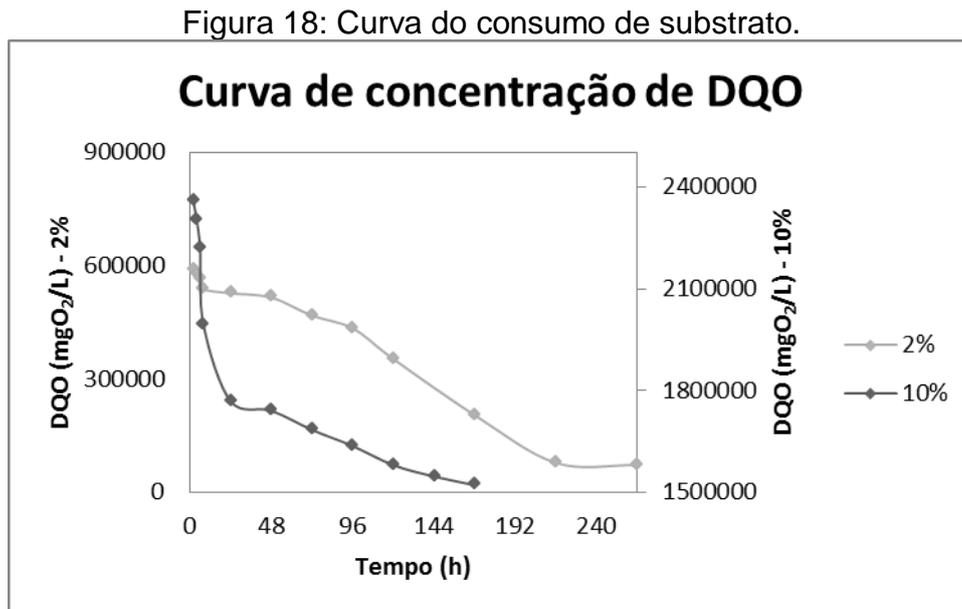
Figura 17: Produção de biossurfactante em termos de Ramnose.



Estudos mostram que uma baixa concentração de biossurfactantes é suficiente para reduzir ao máximo as tensões superficial (água/ar) e interfacial (água/óleo). Zhang e Miller, 1992, apud Banincasa et al., 2004, relatam que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a Concentração Micelar Crítica, ou seja, a concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas, está tipicamente entre 1 a 200 mg/L, valores atingidos nos dois experimentos.

5.2.3 CONSUMO DA FONTE DE CARBONO

O consumo do substrato apresentou um comportamento semelhante nos dois experimentos, tendo uma maior redução na concentração de carbono quando o crescimento celular apresentava sua maior taxa. Os resultados podem ser observados na figura 18 abaixo.



5.2.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

O estudo de emulsificação foi realizado utilizando o sobrenadante livre de células do cultivo em 5% de glicerina, onde se obteve a maior quantidade de biossurfactante produzido. Para o estudo foi adicionado óleo bruto e diesel no sobrenadante, segundo o procedimento anteriormente descrito. Verificou-se que os dois sobrenadantes testados foram emulsificados pelo biossurfactante, como pode ser observado na figura 19 e tabela 4 abaixo.

Figura 19: A) Controle e óleo bruto após emulsificação; B) Controle e diesel após emulsificação.

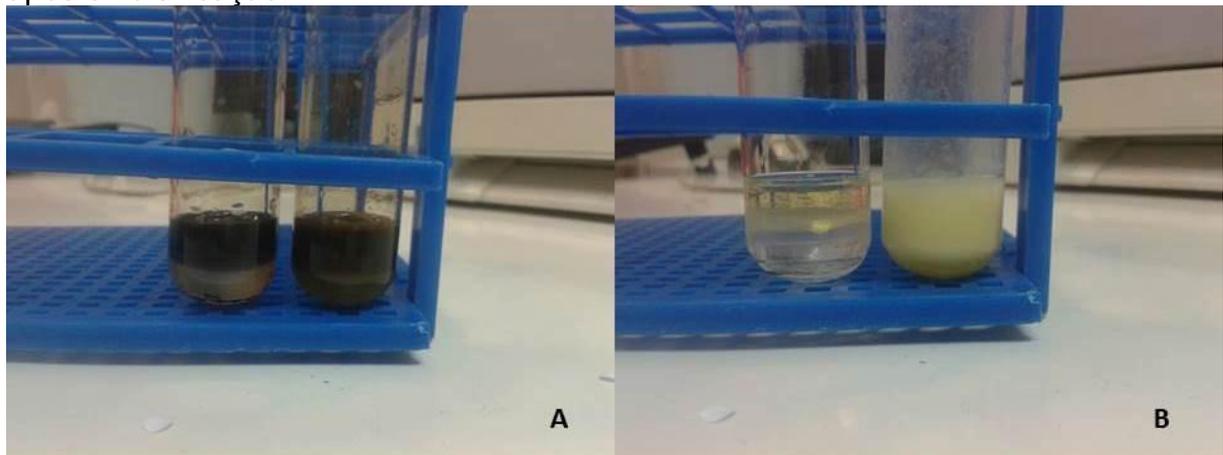


Tabela 4: Porcentagem de emulsificação.

Hidrocarboneto avaliado	% emulsificação
Óleo bruto	62,5%
Diesel	76,3%

Os resultados obtidos estão dentro do esperado. Segundo Guerra-Santos, 1984, os ramnolípídeos estão entre os mais efetivos biossurfactantes, pois apresentam alta capacidade de emulsificação de hidrocarbonetos, entre 50 e 80%.

5.3 TESTE DE BIODEGRADAÇÃO

As figuras 20 e 21 abaixo apresentam o percentual de Óleos & Graxas durante o processo de biorremediação (bioaugmentação e atenuação natural) do solo contaminado com óleo bruto e com diesel.

Figura 20: Porcentagem de petróleo presente no solo.

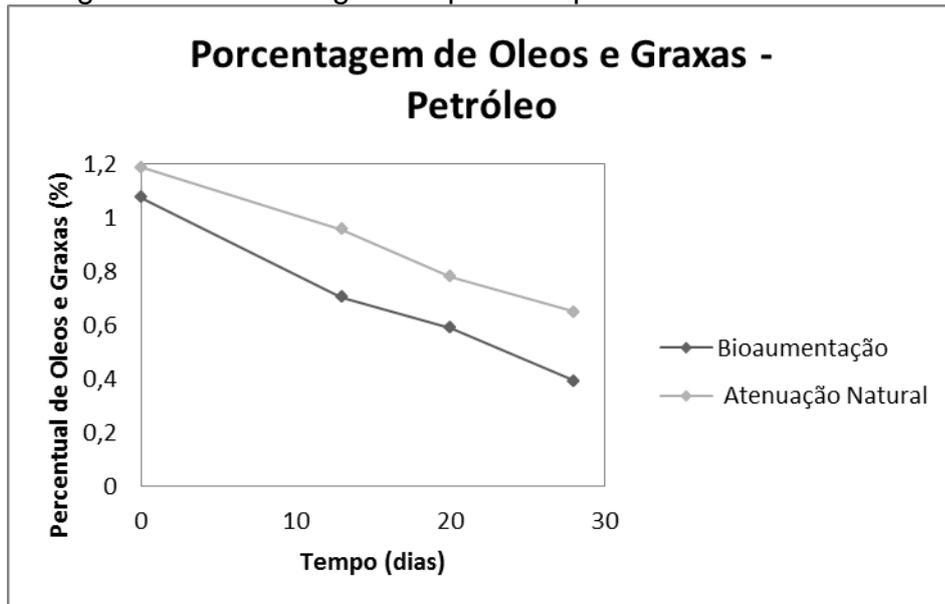
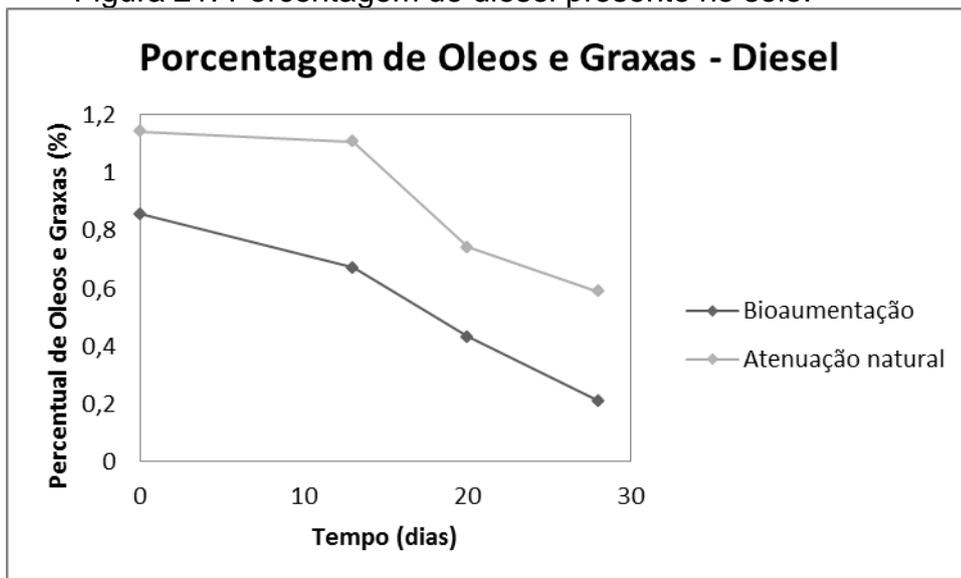


Figura 21: Porcentagem de diesel presente no solo.



Na tabela 5 abaixo se encontram os resultados para a taxa de remoção para o período total de análise (28 dias).

Tabela 5: Resultados da remoção de óleos e graxas.

% de remoção de Óleos e Graxas (%RO&G)		
Composto	Tipo de Biorremediação	%RO&G
Óleo bruto	Bioaumentação	63,50%
Óleo bruto	Atenuação Natural	45,36%
Diesel	Bioaumentação	75,47%
Diesel	Atenuação Natural	48,51%

Verifica-se na tabela que o diesel foi o composto mais facilmente removido, independentemente do processo de biorremediação usado. Sendo os resultados do processo de bioaumentação significativamente superiores, tanto para o óleo bruto como para o diesel.

O fato de o diesel apresentar melhores resultados, quando comparado ao óleo bruto, pode ser explicado por este apresentar estruturas orgânicas mais simples (hidrocarbonetos cuja cadeia contém de 10 a 50 átomos de carbono), mais facilmente biodegradáveis do que os hidrocarbonetos do óleo bruto (mistura complexa de hidrocarbonetos e de impurezas, como enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio e outros).

Baptista e Rizzo (2004) realizaram estudos acompanhando o processo de atenuação natural de solo contaminado por petróleo. Os resultados obtidos nos dois primeiros meses de acompanhamento do processo de atenuação natural de duas amostras de solo contaminado com 5 e 10% de óleo cru indicaram uma redução de 5 e 12%, respectivamente, no teor do contaminante. No entanto, nesse estudo foram utilizadas amostras de solo maior, o que dificultava a aeração do meio e conseqüentemente a ação dos microrganismos presentes. Além disso, o grau de contaminação do solo foi mais elevado, o que pode ter provocado a necessidade de um período maior de adaptação.

6 CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho, foi possível concluir que a utilização da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* no processo de biodecomposição de óleo bruto é um método promissor, pois a cepa microbiana desenvolvida em solo contaminado pelo hidrocarboneto apresentou resultados positivos tanto no consumo de carbono, quanto na produção do biossurfactante ramnolipídeo.

Melhores resultados foram apresentados com o aumento da concentração do substrato, pois garantiu uma fonte de carbono suficiente para manter o crescimento da bactéria e não provocar o consumo do próprio produto, no caso o biossurfactante. Assim, o experimento realizado com uma concentração de 10% de glicerina atingiu valores de 12,085 g/L de massa microbiana e 98,38 mg/L de biossurfactante em termos de ramnose. Porém, ao final do experimento, eles se encontravam em fase exponencial de crescimento, podendo atingir valores mais elevados, caso ocorresse a continuidade do ensaio.

O biossurfactante produzido apresentou a capacidade de emulsificação dos dois hidrocarbonetos testados (petróleo e diesel). Isto permitiu a verificação da aplicabilidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediação de áreas contaminadas.

Ao testar a capacidade do microrganismo na remediação de solos contaminados, este apresentou resultados satisfatórios, visto que o processo de bioaugmentação apresentou melhores resultados quando comparado ao processo de atenuação natural, mostrando-se um método viável quando há a necessidade da rápida degradação dos contaminantes presentes no solo.

O estudo também mostrou que o diesel foi mais facilmente degradado, quando comparado ao óleo bruto, por ser uma mistura mais simples de hidrocarbonetos, tornando mais fácil a quebra de cadeias carbônicas.

Também é notório que, ao final do experimento, mesmo após a remoção de 63,5% do petróleo presente no solo, a areia ainda permanecia com uma tonalidade escura. Isto se deve ao fato de que o petróleo nunca é completamente degradado, permanecendo um resíduo complexo, geralmente um piche preto. Entretanto este resíduo possui baixa toxicidade e torna-se um contaminante inerte ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ATLAS, Ronald. Fate of Petroleum Polluants in Arctic Ecosystems. **Water Science Technology**, v. 18, n. 2, p. 59-67, 1986.
- ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.31, p.178-182, 1995.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 1998.
- BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal. Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 155-164, 1998.
- BAPTISTA, P. M., RIZZO, A. C. de. L. **Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo**. XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2004.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surfactant properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.85, p.1-8, 2004.
- BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, v.33(2), p. 180-189, 1995.
- BORSATO, D.; MOREIRA, I.; GALÃO, O. Combustíveis fósseis: Carvão e Petróleo. 1 ed. **Londrina: EDUEL**. v. 1. 164 p., 2009.
- CAMEOTRA, S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**, v. 8, 16 p., 2009.
- CETESB. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **O Gerenciamento de áreas contaminadas no Estado de São Paulo**, 2008. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf Acesso em: nov. 2013.
- CHANDRASEKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituent analysis of glycoaminoglycans. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.III, Academic Press, New York, p. 89-96, 1980.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. **Production of Biosurfactants**. In: Kosaric, N. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Ed. Marcel Dekker, 1993. p.65-97.

FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G. Z. **Bioremediação de solos: estado da arte**. Disponível

em: <[http://www.Daqbi.cefet.br/professores/mauricio/pedologia/Bioremediacao% e7%e3odesolo.pdf](http://www.Daqbi.cefet.br/professores/mauricio/pedologia/Bioremediacao%e7%e3odesolo.pdf)>. Acesso em: ago. 2013.

FERREIRA, Sayonara. **Estudos laboratoriais para avaliação do potencial de contaminação de água e de solo por gasolina oxigenada**. 2000. 257 f. Doutorado (Programa de Pós Graduação em Geotecnia – Mestrado e Doutorado) - Universidade de São Carlos, São Carlos, 2000.

FONSECA, Martha. **Química: química orgânica**. Ed. São Paulo: FTD, 368 p., 1992.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biosurfactante por levedura. **Quim. Nova**, V.31, N°8, p.2091-2099, 2008.

GIBOTTI, M., J. **Subsídios geológico-geotécnicos para a implantação de tanques de armazenagem subterrânea de combustíveis: estudo de caso em um solo da Formação Rio Claro**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Unesp – Rio Claro, 1999.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.2, p.301-305, 1984.

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

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.4, p.295-304, 2001.

KRONEMBERGER, F.A; SANTA ANNA, L.M.M.; MENEZES, R.R.; FERNANDES, A.C.L.B.; BORGES, C.P.; FREIRE, D.M.G. **Controle da Oxigenação na Produção de Biosurfactantes em Biorreator**, SINAFERM, Curitiba-PR, 2007.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potencial. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 51, p.22-32, 1999.

MARIANO, Adriano. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel**. 2006. 162 f. Doutorado (Programa de Pós Graduação em Geociências e Meio Ambiente – Mestrado e Doutorado) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARIANO, A. P. et al. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MENEGHETTI, Liliane. **Bioremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. 2007. 112 f. Mestrado (Programa de Pós Graduação em Engenharia) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

OLIVEIRA, F. J. S; VASQUEZ, L.; FRANÇA, F. P. **Production of biosurfactants by Pseudomonas alcaligenes using palm oil**. In: 2TH MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING (ENPROMER), Costa Verde – RJ, Brazil, 2005.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. **Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por Aspergillus Niger e Penicillium Corylophilum**. Disponível em: <http://www.scielo.com.br/>. Acesso em: out. 2013.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.9, p.671 – 674, 1997.

RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L. **Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. X Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT. 2002.

RAMOS, Usaldo. **Estudo da biodegradação de gasolina por bactérias presentes no solo da área de armazenamento e distribuição de combustíveis no município de ribeirão Preto**. 2006. 108 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental - Mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

ROBERT, M. et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa 44T1. **Biotechnol. Letters**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.

SANCHES, L. E. A. **Desativação de empreendimentos industriais: um estudo sobre o passivo ambiental**. Tese (Livre Docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1998.

SARKAR, D. et al. 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.

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

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F.J.; ESPUNY, M.J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J.A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a rhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, V.307, p.246-253, 2007.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996. vol.2.

SOUZA, D. B.; BRITO, G. C. B.; VANCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L. C. Estudo de micro-organismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. **Revista de estudos ambientais**, Blumenau, v. 12, n. 2, p. 38-46, 2010.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

STOKSTAD, E. Factory study shows low levels of benzene reduce blood cell counts, **Science**, v.306, p.1665, 2004.

TROVÃO, Renata. **Análise ambiental de solos e águas subterrâneas contaminadas com gasolina: Estudo de caso do Município de Guarulhos-SP**. 2006. 157 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologias – Mestrado e Doutorado) – Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TUMMLER, K.; EFFENBERG, F.; SYLDATK, C. Na integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.105, p.563-571, 2003.

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