

Mariana Pereira dos Santos Silva

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PRODUTORAS DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE A
PARTIR DE BIOPILHAS PARA O TRATAMENTO DE RESÍDUOS
OLEOSOS

Belo Horizonte

2012

Mariana Pereira dos Santos Silva

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PRODUTORAS DE COMPOSTOS ATIVOS DE SUPERFÍCIE A
PARTIR DE BIOPILHAS PARA O TRATAMENTO DE RESÍDUOS
OLEOSOS

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia.*

Orientadora: Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Belo Horizonte

2012

AGRADECIMENTOS

Quero expressar os meus melhores agradecimentos e o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho:

À Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos, agradeço pela oportunidade e orientação científica, bem como pelo incentivo, amizade, confiança depositada, disponibilidade e o apoio ao longo de todo o trabalho em especial durante a escrita da dissertação e revisão final;

Ao professor Dr. Paulo Henrique Graziotti pelas amostras cedidas;

Ao Prof. Dr. Marcelo Santoro, pelo carinho, disponibilidade e ajuda na execução dos cálculos;

À professora Andrea pela amizade, orientação técnica e científica disponibilizada no desenvolvimento deste trabalho, que muito contribuiu para a sua execução;

À Professora Dra. Regina Nardi pelo apoio durante a graduação e a pós-graduação;

Aos Amigos e Colegas de Laboratório de Microbiologia Aplicada tenho a agradecer o companheirismo nos bons e maus momentos, o agradável convívio, o ótimo ambiente de trabalho que me proporcionaram, a amizade partilhada e toda a ajuda despendida;

Ao Rafael pela amizade durante esses anos, e pelos bons momentos de diversão;

À Aline pelo carinho, amizade e ajuda inestimáveis para a conclusão deste trabalho;

À Patrícia pela amizade, dedicação, companheirismo e grande auxílio prestado no decorrer dos experimentos;

À Renata Maria Gomes da Fonseca pela ajuda nos momentos de aperto;

Aos meus pais e meu irmão por sempre acreditarem em mim, por me aplaudirem e me segurarem nos momentos de fraqueza e me aguentarem nos momentos de

escrita desta dissertação;

À toda minha família por estar sempre por perto, pela torcida e pelo apoio emocional;

À FAPEMIG pelo apoio financeiro cedido;

Ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade;

A todos os meus amigos (do colégio, da graduação, do mestrado), agradeço pela amizade, carinho, apoio, incentivo e coragem que sempre me deram em todos os momentos. E a todos os que, de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Lista de figuras

- Figura 1: Gráfico relacionando a concentração de surfactante com as propriedades físicas tensão superficial e interfacial (Adaptado de Mulligan, 2005)pg 7
- Figura 2: Processos de estabilização de emulsões. Na estabilização eletrostática (A), ocorre a adsorção de surfactantes aniônicos em torno da gota de óleo formando uma dupla camada, que é balanceada pelos contra-íons e na estabilização estérica (B), níveis altos de emulsificantes não iônicos e poliméricos induzem a estabilização principalmente pelos efeitos estéricos (Coutinho, 2009)pg 16
- Figura 3: Esquema de como uma bactéria pode promover (A) ou inibir (B) a coalescência de emulsões. A ou B ocorrem dependendo de como a superfície bacteriana é efetivamente molhada pela fase descontínua da emulsão. A capacidade de molhar as superfícies celulares é determinada pelos ângulos de contato de equilíbrio (α e β) para uma emulsão A/O (Kosaric et al., 1982).....pg 19
- Figura 4: Nessa figura o ângulo de contato é representado pela letra Θ . Ângulos com baixos valores de Θ ($\Theta < 90$) indicam que o líquido espalha ou molha bem a superfície. Altos valores de Θ ($\Theta > 90$) indicam que o líquido não espalha bem. Quando $\Theta = 0$ pode-se dizer que ocorreu um “molhamento” completo. Por convenção da literatura esse ângulo é medido na fase aquosa. (Shaw, 1992; Figura BiolinScientific).....pg 20
- Figura 5: Densidade da população degradadora de compostos hidrofóbicos: Óleo diesel (OD), Hexadecano (H) e Óleo Daido-Dairoll PA-5A (OL) para as biopilhas de 30, 60 e 90 dias de decomposição determinada pela técnica de NMP.....pg 48
- Figura 6: Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) das biopilhas de 30, 60 e 90 dias, incubadas por 24, 48 e 72 h em placas Biolog-ECOPATE. Médias seguidas de mesmas letras foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Scott-Knott com nível mínimo de significância de 0,05.pg 52
- Figura 7: Análise de agrupamento dos dados de Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) das biopilhas pelo método de ligação simples considerando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade para as biopilhas de diferentes idades.pg 53
- Figura 8: Análise de agrupamento dos dados de Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) das biopilhas de 30, 60 e 90 dias pelo método de ligação simples considerando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade para as diferentes fontes de carbono.pg 54
- Figura 9: Hidrofobicidade das linhagens isoladas pela técnica do enriquecimento (A) e pela técnica de flotação (B) cultivadas em meio mineral adicionado de óleo diesel e glicose.pg 81

Lista de tabelas

Tabela 1: Fontes de carbono contidas nas microplacas Biolog Ecoplates®. Categorização dos substratos de carbono sugerida por Dobranic e Zak (1999)	pg 28
Tabela 2: Descrição colonial, morfológica, arranjo e densidade dos isolados provenientes das biopilhas de tratamento de resíduos oleosos de diferentes idades.	pg 42
Tabela 3: Índice de diversidade de Shannon para diversidade funcional, riqueza e equitabilidade da comunidade microbiana das biopilhas com diferentes idades.	pg 50
Tabela 4: Descrição morfológica das colônias, morfologia celular e reação tintorial de Gram dos isolados obtidos nas biopilhas de 30, 60 e 90 dias obtidas pelo método de enriquecimento.	pg 56
Tabela 5: Descrição morfológica das colônias, reação tintorial de Gram e morfologia celular dos isolados das biopilhas de tratamento de resíduos oleosos obtidas pelo método de flotação.	pg 59
Tabela 6: Crescimento, hemólise, índice de emulsificação e atividade surfactante após o cultivo em MMB adicionados de OD, H ou G, dos isolados obtidos pelo método de enriquecimento.	pg 70
Tabela 7: Crescimento, hemólise, índice de emulsificação e atividade surfactante após o cultivo em MMB adicionados de OD, H ou G, dos isolados obtidos pelo método de flotação.	pg 74
Tabela 8: Valores de densidade ótica a 600 nm agrupados em 5 classes pela análise de variância.	pg 64
Tabela 9: Diminuição da altura da camada de emulsão pela inoculação de cultura dos isolados, cultivados em MMB acrescidos de óleo diesel ou glicose (1% v/v), em emulsão modelo Span 80- querosene (1:1).	pg 79
Tabela 10: Sequenciamento da região 16S do rDNA dos isolados obtidos com os métodos de enriquecimento e flotação, utilizando os iniciadores 8F e 907R. .	pg 83

1 RESUMO

O objetivo desse trabalho foi isolar micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície (CAS) a partir de um sistema de biopilhas de tratamento de resíduos oleosos. Além disso, caracterizar as biopilhas quanto à população degradadora de compostos hidrofóbicos (óleo diesel, hexadecano e óleo Daido-Dairoll PA-5A), e à diversidade metabólica frente à 31 fontes de carbono presentes no sistema BIOLOG-Ecoplate. A população degradadora variou de 0,005% a 12,5%, para as populações degradadoras de hexadecano e Daido-Dairoll-PA5A, respectivamente. A diversidade metabólica das amostras foi considerada alta, com o consumo de pelo menos 29 fontes de carbono. Ao todo, 74 isolados foram obtidos utilizando duas técnicas de seleção, o enriquecimento e a flotação. Estes isolados foram testados quanto à capacidade de crescer em meio mineral contendo óleo diesel, ou hexadecano ou glicose. O óleo diesel promoveu as maiores médias de crescimento, seguidos de glicose e hexadecano. Além disso, os isolados foram submetidos aos testes de detecção de CAS. Quais sejam: hemólise (39 resultados positivos em pelo menos uma fonte de carbono avaliada), índice de emulsificação (6 resultados positivos em pelo menos uma fonte de carbono) e atividade surfactante (25 resultados positivos em pelo menos uma fonte de carbono). A hemólise foi total em todos os casos analisados. O índice de emulsificação variou de 24 a 70,4%, e a atividade surfactante variou de 0 cm a 81 cm, determinada pelo incremento do diâmetro da gota de sobrenadante em placas de poliestireno. Cerca de 13 isolados foram identificados em um ensaio de sequenciamento da região 16S do rDNA. Os gêneros observados foram *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Pseudomonas* sp., *Nocardioides* sp., *Citrobacter* sp., e *Staphylococcus* sp. Por fim, alguns isolados que apresentaram hemólise em ágar sangue, foram submetidos ao cultivo em meios contendo óleo diesel ou glicose, e submetidos à testes de quebra de emulsão modelo (Span 80-querosene). Dentre os 13 isolados testados, a de-emulsificação foi positiva em todos, para pelo menos uma fonte de carbono avaliada, variando de 0 a 89%. Estes isolados foram caracterizados quanto à hidrofobicidade celular pela técnica de adesão microbiana à hidrocarbonetos (MATH). A hidrofobicidade variou de 0 a 31,7%, de acordo com a fonte de carbono utilizada para o cultivo prévio ao teste, e o método de seleção dos isolados.

Palavras-chave: Compostos ativos de superfície, surfactante, emulsificante, de-emulsificação

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, os compostos ativos de superfície (CAS) microbianos vêm ganhando interesse de pesquisadores e indústrias, devido ao seu potencial de aplicação comercial como substitutos para os CAS sintéticos. Os CAS microbianos apresentam altas atividades surfactantes e emulsificantes e são mais vantajosos do ponto de vista ambiental por serem mais biodegradáveis e menos tóxicos que os CAS sintéticos. Apresentam, também, estabilidade de atividade em condições extremas, o que os tornam adequados para a aplicação na indústria petrolífera, já que a exploração do petróleo bruto se dá em condições de altas temperaturas.

Os CAS são produzidos por diferentes grupos de micro-organismos, bactérias, leveduras e fungos, que sintetizam uma ampla variedade de moléculas anfipáticas, estruturalmente diversas, de acordo com os fatores e as condições de crescimento (fontes de carbono, nitrogênio, pH, salinidade) à que estão submetidos. Alguns papéis fisiológicos para os micro-organismos vem sendo atribuídos às essas substâncias, como a mobilidade, interações célula-célula, diferenciação celular, acesso à substratos.

A principal característica dessas moléculas que vem sendo amplamente estudada é a capacidade de se concentrar em interfaces (atividade de superfície), e que tem aplicação em diversos sistemas industriais. Atualmente, algumas linhagens produtoras se encontram disponíveis comercialmente e podem ser utilizadas em processos de biorremediação de solos contaminados de algumas substâncias, como os hidrocarbonetos. Porém, uma das principais aplicações é a recuperação melhorada do petróleo e seu processamento. O petróleo cru dos reservatórios é altamente viscoso e se encontra aderido às rochas. A utilização dos CAS pode auxiliar na diminuição desta viscosidade e diminuir a adesão dos óleos nas rochas, aumentando a quantidade de óleo extraída.

Outra atividade que esses compostos podem apresentar é a de-emulsificante, que é a desestabilização de sistemas heterogêneos, denominados emulsões, constituídos pela mistura de água e compostos oleosos. Essas emulsões são geradas tanto nas atividades de exploração de petróleo, quanto nas indústrias (lavagem de maquinário contendo óleos, graxas). A separação do óleo desses sistema é im-

portante já que seu descarte direto em corpos d'água contamina o ambiente. Uma alternativa para a separação das fases dos sistemas emulsionados é a utilização dos CAS microbianos que podem desestabilizar esse sistema, separando a água e o óleo.

Entretanto, a comercialização desses compostos não foi totalmente alcançada devido aos altos custos de produção, que não competem com os de produção dos CAS sintéticos. Para contornar este problema, algumas estratégias vem sendo propostas com o intuito de baratear a produção dos CAS, que são: o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, incluindo a otimização de condições fermentativas e de recuperação do produto final; a utilização de substratos e resíduos baratos e o desenvolvimento de linhagens super produtoras.

A diversidade metabólica dos micro-organismos é uma aliada nos estudo de prospecção de novas moléculas biológicas com atividades diversas, incluindo a atividade de superfície. É importante que se possa conhecer o maior número possível de moléculas e suas inúmeras aplicações. Este foi o foco deste trabalho, que procurou selecionar e estudar bactérias produtoras de CAS, que possam ser empregadas no tratamento de efluentes oleosos, provenientes de diversas atividades industriais como a têxtil, a petrolífera, a de plásticos e embalagens, farmacêutica, dentre outras, bem como na formação de emulsões, que também é requerida em diversos processos industriais.

Para este estudo foi utilizado os sistema de biopilhas de tratamentos de resíduos oleosos. Os ambientes contaminados com produtos derivados do petróleo são conhecidos por possuírem uma comunidade microbiana adaptada à essas condições, sendo que os micro-organismos presentes podem ter a capacidade de produzir CAS, que são importantes na utilização dos substratos hidrofóbicos, comumente encontrados em ambientes contaminados com óleos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Compostos ativos de superfície (CAS)

3.1.1 Conceito

Os compostos ativos de superfície ou surfactantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em um sistema, podem adsorver nas superfícies ou interfaces desse sistema, alterando suas energias livres superficiais ou interfaciais respectivamente (Rosen, 2004). Define-se o termo interface como a região entre duas fases imiscíveis quaisquer. Já o termo superfície refere-se a uma interface na qual uma das fases constituintes é um gás, comumente o ar (Rosen, 2004).

As energias livres de Gibbs, representam a quantidade mínima de trabalho necessário para a formação de uma interface. Sendo assim, a configuração mais estável de um sistema interfacial é a de menor área entre as suas fases constituintes (Delcolle, 2005; Rosen, 2004). Estas energias são representadas pelas grandezas tensão interfacial, que corresponde à energia atrativa entre as moléculas de um líquido, e a tensão superficial que é a força exercida por um líquido em contato com um sólido ou outro líquido (Satpute et al., 2010; Rosen, 2004).

A tensão interfacial e superficial são também medidas do grau de diferença na natureza (viscosidade, densidade, polaridade) entre as fases constituintes de um sistema (Rosen, 2004). Quanto maior a diferença na natureza dessas fases, maior é a medida da tensão interfacial (ou superficial) entre elas (Rosen, 2004). Os compostos ativos de superfície (CAS) são substâncias que diminuem a quantidade de trabalho necessário para a formação ou expansão das interfaces (Rosen, 2004).

Em um sistema heterogêneo, com pelo menos duas fases, a região de interação entre as moléculas constituintes é a região de atuação dos compostos ativos de superfície (CAS), e as cargas presentes nessas moléculas irão determinar, em parte, os tipos de interações que se estabelecerão nesse sistema (Rosen, 2004). Os CAS possuem natureza anfipática devido à presença de um grupo hidrofílico e

hidrofóbico em uma mesma estrutura (Rosen, 2004). Em sistemas aquosos, essas moléculas podem se agregar na interface ar-água formando arranjos denominados micelas. Nelas, as moléculas de surfactantes estão orientadas de tal modo que as regiões não polares, hidrofóbicas, estão em máximo contato umas com as outras, formando um cerne hidrofóbico, e as regiões polares hidrofílicas estão em contato com a fase aquosa (Mulligan, 2005; Rosen, 2004). A configuração espacial das micelas ocorre de modo a minimizar a repulsão entre os grupos hidrofóbicos das moléculas de surfactante e a água (Lima, 2008). Para que ocorra a formação dessas estruturas é necessária a agregação de um número mínimo de moléculas de surfactantes. Sendo assim, a formação destes arranjos está relacionada com a concentração micelar crítica (CMC), que é um número específico de moléculas de surfactante presente em solução aquosa a partir do qual é desencadeada a formação das micelas (Laha et al., 2009; Rosen, 2004; Neu, 1996).

Abaixo da CMC, os surfactantes estão presentes na forma de monômeros e diminuem a tensão superficial do meio aquoso, por se disporem em sua superfície, promovendo uma distorção nela, alterando as forças de atração entre as moléculas de água (Lima, 2008). Em concentrações iguais ou superiores, tem-se a formação de micelas, e não se observa alterações nas tensões superficial e interfacial, pelo fato das micelas se disporem em todo o meio aquoso (Lima, 2008). A figura 1 mostra a relação entre a concentração de surfactante e as alterações nas tensões superficiais e interfaciais. Cada surfactante possui sua CMC específica, e a medida da eficiência de um surfactante é dada pela capacidade deste em reduzir a tensão superficial ou interfacial com menores concentrações de monômeros de surfactantes (Mulligan, 2005).

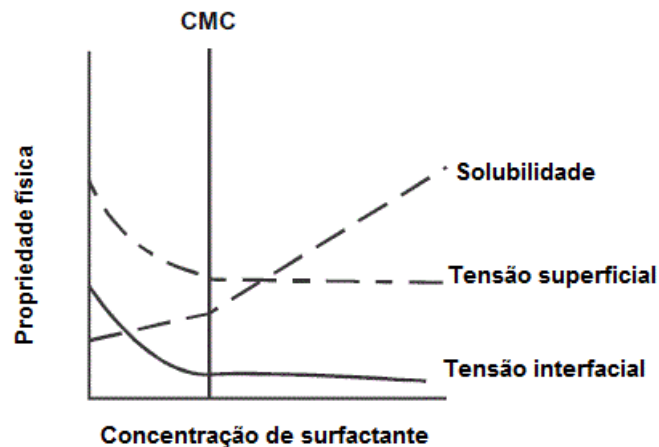


Figura 1: Gráfico relacionando a concentração de surfactante com as propriedades físicas tensão superficial e interfacial (Adaptado de Mulligan, 2005).

Além da CMC, os CAS podem ser caracterizados pelo balanço hidrofílico-hidrofóbico, sua estrutura química, a carga, assim como as fontes das quais são derivados (Rosenberg & Ron, 1999). Os grupos hidrofóbicos podem ser ácidos graxos, parafinas, olefinas, alquil-benzenos, alcoóis, alquil-fenóis e os polioxipropilenos. Já os grupos hidrofílicos mais comuns são os grupos sulfonato, sulfato, carboxilato, amônio quaternário, polioxietileno, sucrose e polipeptídeo (Swisher, 1987).

Os surfactantes podem ainda serem agrupados de acordo com a carga que apresentam em aniônicos, para aqueles que possuem íons carregados negativamente em solução aquosa; em catiônicos, para os carregados positivamente; não iônicos para aqueles que possuem grupos hidrofílicos que não ionizam consideravelmente em solução e anfotéricos, que podem apresentar propriedades de grupos polares aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH do meio (Van Hamme et al., 2006; Souza, 2003; Swisher, 1987).

3.1.2 CAS Microbianos

Os micro-organismos são capazes de sintetizar vários tipos de CAS (Desai & Banat, 1997). De acordo com Neu (1996), esses compostos podem ser classificados

em três grupos: os de baixo peso molecular, comumente denominados de biosurfactantes, os que possuem alto peso molecular com uma região hidrofóbica em uma extremidade da molécula, neste caso a terminologia mais adequada utilizada é “polímeros anfifílicos” e por fim, os polímeros polifílicos são aqueles que possuem regiões hidrofóbicas ao longo de toda a molécula polimérica (Neu, 1996).

Os CAS de origem microbiana podem ser do tipo glicolipídeo, lipopeptídeo, fosfolipídeos e ácidos graxos, todos apresentando baixo peso molecular (biosurfactantes), ou do tipo lipoproteínas, lipopolissacarídeos, polissacarídeos, estes possuindo alto peso molecular (bioemulsificantes) (Desai & Banat, 1997). Existem ainda os surfactantes particulados que são vesículas membranosas extracelulares, ou células microbianas com propriedades tenso-ativas (Lima, 2008; Desai & Banat, 1997). A composição química da região hidrofóbica dos CAS microbianos consiste principalmente de ácidos graxos saturados e insaturados, e a porção hidrofílica de aminoácidos, peptídeos aniônicos ou catiônicos, mono, di, ou polissacarídeos (Desai & Banat, 1997).

Essas moléculas podem ser encontradas intracelularmente, extracelularmente ou ligados à membrana celular dos microorganismos (Neu, 1996). Os CAS como os glicolipídeos diminuem a tensão interfacial e superficial nas interfaces (Salihu, 2009). Um exemplo desse tipo de molécula é o glicolipídeo produzido por algumas espécies do gênero *Pseudomonas* que pode reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores como 29 mN/m (Mulligan, 2005). Já os CAS como os lipopolissacarídeos são mais eficazes em estabilizar as forças em sistemas constituídos por líquidos imiscíveis, como as emulsões oleosas (Rosenberg & Ron, 1997; Salihu, 2009). Um exemplo destes compostos é o CAS polimérico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, também conhecido como bioemulsan. Este composto ativo de superfície tem em sua estrutura polimérica uma longa cadeia de ácidos graxos covalentemente ligados a um heteropolissacarídeo aniônico. Os grupos hidrofóbicos se distribuem por toda a molécula polimérica (Rosenberg & Ron, 1997). Os surfactantes particulados podem ser células microbianas com hidrofobicidade elevada, e constituem por si só uma “partícula” tenso-ativa. Algumas espécies de cianobactérias e bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Serratia* sp. podem ser consideradas desse tipo de surfactante (Lima, 2008).

3.1.2.1 Papel fisiológico dos compostos ativos de superfície para os micro-organismos

Os CAS são produzidos por muitos micro-organismos. Estas moléculas possuem grande diversidade de estruturas químicas e propriedades superficiais (Ron & Rosemberg 2001). Portanto, é esperado que os CAS de micro-organismos diferentes apresentem funções fisiológicas diferentes, que possibilitem ao organismo uma maior competitividade em um determinado nicho ecológico (Ron & Rosemberg, 2001).

Alguns CAS microbianos apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. Um estudo realizado por Pyoung Il e colaboradores (2009) identificou uma linhagem de *Bacillus subtilis* (CMB 32), isolada de solo, com potencial para inibir o crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Foram montados experimentos de inibição de crescimento, onde discos de papel embebidos com culturas bacterianas foram dispostos em placas de ágar BDA, juntamente com o inóculo do fungo. Os agentes antifúngicos obtidos por meio do cultivo dos micro-organismos em caldo M9 foram extraídos utilizando os solventes clorofórmio/metanol, e purificados com o auxílio de técnicas cromatográficas. Após a determinação da massa molecular, os agentes foram identificados como os lipopeptídeos iturina A, fengicina e surfactina A.

Os micro-organismos possuem a capacidade de aumentar a disponibilidade de muitos substratos insolúveis em água, cuja biodegradação é limitada por sua baixa solubilidade. O hexadecano é um destes substratos, e constitui em um importante componente de alguns produtos do petróleo, como o óleo diesel. Os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, produzem compostos ativos de superfície capazes de formar micelas, aumentando a solubilidade aparente de compostos pouco solúveis. O acesso a esses compostos pode ocorrer também, por meio do contato direto com moléculas pouco solúveis. Neste caso, a hidrofobicidade da superfície celular e do substrato em questão são características que irão influenciar esta interação (Cameotra & Singh, 2009).

Na solubilização dos compostos hidrofóbicos por meio de estruturas micelares, tem-se que, abaixo da CMC de determinado surfactante, a biodisponibilidade

pode ocorrer por uma diminuição da tensão superficial do composto hidrofóbico, permitindo que o micro-organismo possa interagir melhor com essa molécula. Acima da CMC, o substrato hidrofóbico pode ser particionado nas micelas, permitindo um maior contato com as células, ou fundido diretamente com as membranas celulares, resultando em uma entrega direta de substrato à célula microbiana (Miller & Bartha, 1989).

Os CAS pode modificar a natureza da superfície celular por meio de uma ação detergente. Em um estudo realizado por Al-Tahhan et al., 2000, duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027 e ATCC 27853) foram cultivadas em meio contendo glicose e hexadecano, adicionados de ramnolípídeo produzido pela linhagem ATCC 9027, para investigar as mudanças químicas e estruturais celulares que ocorriam na presença desse CAS. Os autores observaram que estes surfactantes promoviam uma perda no conteúdo de ácidos graxos celulares. A perda deste conteúdo foi atribuída à liberação do LPS (lipopolissacarídeo), sendo que a quantidade de LPS perdida era dependente da concentração de ramnolípídeo acrescentado. Essa liberação é o provável mecanismo que ocasionou o aumento da hidrofobicidade celular das duas linhagens cultivadas nos meios contendo glicose e hexadecano.

Os CAS podem exercer funções importantes na ligação e liberação das células microbianas em superfícies. Também, podem estar envolvidos na patogênese microbiana, sistemas de “*quorum sensing*”, formação de biofilmes e ainda reduzir a toxicidade causada por metais pesados (Ron & Rosenberg, 2001).

A capacidade de alterar o comportamento das interfaces e das moléculas em solução faz dos surfactantes agentes que possibilitam a interação dos micro-organismos com o ambiente. A vida microbiana pode ser mais comum nas interfaces. Estima-se que menos de 0,1% dos micro-organismos sejam planctônicos (Hamme et al., 2006). A existência dos biofilmes microbianos é, de fato, um excelente exemplo de como a vida microbiana depende das relações interfaciais. A parede celular é uma das interfaces mais evidentes, por meio da qual ocorrem essas interações (Peixoto, 2008).

Como citado anteriormente, os compostos ativos de superfície podem estar liga-

dos à parede celular ou serem excretados. Para os primeiros, a orientação pela qual essa ligação ocorre pode diferir entre os organismos. Pode ocorrer o “ancoramento” dessas moléculas por meio de suas regiões hidrofóbicas, sendo que a região hidrofílica da molécula é exposta, e o micro-organismo pode interagir com uma interface de mesma natureza. Um exemplo desse tipo de interação é fornecido pelos lipídeos da membrana externa de bactérias Gram negativas. Se os CAS são ligados por meio de sua porção hidrofílica, então a região hidrofóbica da molécula é exposta, e pode ocorrer a interação com superfícies hidrofóbicas. Bactérias do gênero *Mycobacterium* possuem parede celular rica em ácidos micólicos altamente hidrofóbicos, dispostos para o exterior, que permitem a essas bactérias a ligação às superfícies hidrofóbicas (Neu, 1996).

Se os CAS forem liberados da parede celular ou excretados para o ambiente, os micro-organismos podem se desligar das superfícies. A liberação de um CAS em uma fase aquosa pode ser responsável pela formação de um filme condicionante em uma interface. Em uma interface hidrofóbica, este filme irá mudar a interface de hidrofóbica para hidrofílica, favorecendo a adesão de células hidrofílicas (Neu, 1996). Este processo consiste em uma das primeiras etapas na formação de biofilmes.

3.2 Aplicações dos compostos ativos de superfície microbianos

As características mencionadas anteriormente fazem dos surfactantes moléculas versáteis, que podem ter aplicações em diversos setores industriais. Eles podem ser utilizados como emulsificantes, de-emulsificantes e tenso-ativos (Cairns et al., 1982; Desai e Banat, 1997). Ainda existem as aplicações na área médica, na indústria cosmética, dentre outras. Pode-se dizer que a indústria petrolífera é um dos setores que mais utiliza esses compostos. Seu papel é melhorar a recuperação do petróleo nos processos de exploração, já que os surfactantes podem reduzir a tensão interfacial do óleo e da água, além de diminuir a viscosidade do óleo, facilitando o processo de bombeamento (Van Hamme et al., 2006).

Na biorremediação, esses CAS microbianos vem sendo avaliados na utilização em campo e em laboratório como substitutos aos surfactantes sintetizados quimicamente, com o objetivo de aumentar as taxas de remoção de contaminantes do solo e da água, incluindo compostos orgânicos e metais pesados. No ambiente,

os micro-organismos podem interagir com substratos hidrofóbicos por meio de mecanismos como a emulsificação, micelarização, adesão-desorção. A emulsificação compreende na dispersão de um líquido em outro (água e óleo), dessa maneira as gotas de óleo ficam no interior das micelas, em contato com a região hidrofóbica dos CAS, e o micro-organismo pode interagir com a parte hidrofílica da molécula. A micelarização resulta na partição de uma quantidade significativa de compostos dentro das micelas, aumentando sua biodisponibilidade para os micro-organismos. O processo de adesão-desorção consiste no fato de a presença dos CAS promoverem o aumento da hidrofobicidade da pare celular, por meio da perda da camada de LPS, altamente hidrofílica. A desorção é um mecanismo que culmina na diminuição da adesão das partículas de óleo a uma superfície, como o solo. Essa diminuição é resultado da redução das tensões superficiais e interfaciais, das forças capilares, da “molhabilidade” e do aumento do ângulo de contato do óleo com as partículas do solo (Franzetti et al., 2008).

3.2.1 Aplicação dos compostos ativos de superfície microbianos no tratamento de efluentes emulsionados

Os óleos e graxas podem estar presentes na água oleosa em duas formas distintas: livres ou emulsionados. O óleo livre corresponde a uma fase visivelmente distinta da fase aquosa, isto é, ele não se mistura com a água, e pela sua densidade aparece flutuando na superfície da água ou como gotículas em suspensão, sendo facilmente identificável na água oleosa. Quando a água oleosa contém óleo emulsionado, este se encontra intimamente misturado e estabilizado na água, que a sua presença não pode ser distinguida a olho nu. Visualmente, tem-se um sistema "monofásico" água-óleo conhecido como emulsão (Coutinho, 2009).

Emulsões são geradas em vários processos industriais. Elas podem conferir propriedades funcionais aos produtos (alimentos, cosméticos) ou são provenientes de operações físicas e químicas, como por exemplo, a exploração e recuperação do petróleo. A própria utilização dos surfactantes na área petrolífera gera emulsões. Estima-se que 80% do óleo cru explorado mundialmente estejam emulsionados. Indústrias envolvidas com a mineração e recuperação de metais, produção e processamento de químicos, produção de plásticos e materiais de revestimento, agricultura, farmacêutica, produção e processamento de óleos e

gorduras comestíveis e alimentos, em geral, envolvem em vários estágios da operação, a utilização e a pré-formação de algum tipo de emulsão (Kosaric et al., 1987).

O processo de extração do petróleo utiliza grandes volumes de água, em todas as suas etapas. Após o final da extração, a água utilizada geralmente apresenta as seguintes contaminações: óleo livre, que engloba uma mistura de hidrocarbonetos com faixa de massa molar extensa, podendo variar de um a trinta átomos de carbono. Na água produzida, o óleo livre pode ser facilmente visualizado nas regiões superficiais da água, seja em forma de gotas e/ou manchas. O óleo pode estar dissolvido e corresponde à parcela que não pode ser distinguida por simples visualização e é constituído, majoritariamente, por hidrocarbonetos de baixa massa molar e que, em geral, são tóxicos. Outro componente importante dos resíduos petrolíferos é o óleo emulsionado, que corresponde à parte do óleo que se encontra estabilizado na água por substâncias anfifílicas de baixa massa molar. Ainda podem ser encontrados alto teor de sais, metais pesados, sólidos suspensos, frações de substâncias radioativas e micro-organismos (Silva, 2010).

A geração de efluentes emulsionados necessita de especial atenção, já que esses não podem ser descartados diretamente em cursos d'água. Geralmente esses efluentes são submetidos a tratamentos com reagentes sintéticos e processos físicos como a decantação, centrifugação, flotação, dentre outros. Porém esses tratamentos apresentam restrições, tanto a utilização de produtos sintéticos, que geralmente são pouco biodegradáveis e possuem toxicidade considerável, como os processos físicos que muitas vezes não conseguem remover o óleo emulsionado. Pode-se mencionar ainda, os tratamentos com calor, eletricidade, que demandam recursos financeiros elevados (Nabi et al., 2000; Colle, 2005; Singh et al., 2007; Coutinho, 2009).

Os processos de tratamento dos efluentes gerados na indústria petroquímica objetivam reduzir a carga orgânica, sua toxicidade inerente, a carga oleosa incluindo óleos emulsionados, a presença de compostos nitrogenados, dentre outros. Este tratamento inclui uma etapa preliminar, que consiste na remoção de areia e separação da água e óleo. Tratamento primário para a clarificação físico-química dos efluentes (remoção de óleos emulsionados, metais pesados, sulfetos e compostos

orgânicos tóxicos). Nesse caso recomenda-se a utilização de flutuadores a ar dissolvido ou ejetado. E por fim, o tratamento secundário que utiliza lagoas aeradas ou lodos ativados, capazes de remover a matéria orgânica dissolvida e em suspensão (Giordano, 2004).

Em especial, no tratamento de efluentes oleosos, os processos de microfiltração e ultrafiltração, que utilizam membranas porosas, têm sido empregados para a quebra e separação de óleo emulsionado. Entretanto, estas membranas não possuem a capacidade de reter material solúvel, como hidrocarbonetos e sais de baixa massa molar que apresentam algum potencial risco ao meio ambiente. Este aspecto revela a necessidade de um ou mais estágios de tratamento capazes de remover estas substâncias (Silva, 2010).

A resolução 357/2005 do CONAMA, dedica um capítulo à parte (IV) no que diz respeito ao lançamento de efluentes em corpos d'água. No artigo 34, parágrafo 4, a concentração de óleos minerais no efluente permitida para o lançamento em corpos de água é de até 20mg/L e de óleos vegetais e gorduras animais é de até 50mg/L (CONAMA, 2005).

3.3 Características das emulsões

As emulsões são sistemas heterogêneos, formados por pelo menos duas fases líquidas. Uma dessas fases, geralmente em maior concentração, é denominada fase contínua, na qual se encontram dispersas as moléculas do outro líquido, a fase descontínua (Desai e Banat, 1997). A constituição das fases pode ser água ou uma solução aquosa e algum hidrocarboneto. Sendo assim, é possível classificar as emulsões em água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A), dependendo da composição da fase contínua. Emulsões A/O possuem gotas de água dispersas em uma fase contínua de óleo e as emulsões O/A são constituídas de gotas de óleo dispersas em uma fase contínua de água (Neves, 2002; Coutinho, 2009).

Em geral, as emulsões são compostas por três fases: fase aquosa (hidrofílica), fase oleosa (lipofílica) e a fase emulgente (tensoativo-hidrofílico/lipofílico) (Pinho & Storpirts, 1998). Caso não esteja presente a fase emulgente e a fase interna se mantiver dispersa sob agitação, as gotículas dispersas se unem umas às outras

e, em seguida, formam uma única fase separada quando a agitação cessar. Quando um líquido é dividido em pequenas partículas, a área superficial dos glóbulos constitui uma superfície enorme comparada com a área da superfície do líquido original. Para que a dispersão seja realizada, é necessário despende certa quantidade de energia, denominada de fator mecânico (Prista et al., 1992).

O aumento da energia, associado com a área, é suficiente para tornar o sistema termodinamicamente instável, o que leva a coalescência. O segundo princípio da termodinâmica afirma que todo o sistema físico tende a perder energia quando se encontra a nível energético superior ao inicial. Para prevenir a coalescência é necessário introduzir um agente emulsificador. O emprego de agentes emulsificantes tem como finalidade reduzir a tensão interfacial a valores muito pequenos, aumentando a estabilidade do sistema com a formação de uma película (filme) aderida à superfície dos glóbulos da fase dispersa (Martin, 1967).

A formação de emulsões envolve o aumento da área interfacial, requerendo assim um gasto de energia. Isso ocorre porque quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato a tendência é que se formem duas fases distintas, de menor área interfacial, representando a configuração mais estável desse sistema (Delcolle, 2005). A utilização de agentes de superfície permite que ocorra a estabilização desse sistema, visto que ocorre a diminuição da tensão superficial (Robbins, 2000; Leunissen et al., 2007). Como os surfactantes se organizam na interface ocorre uma alteração na superfície da água, diminuindo assim a tensão superficial (Robbins, 2000). Os surfactantes também podem estabilizar as emulsões de duas outras formas. Uma delas é a estabilização estérica, que é proveniente da formação de um filme rígido interfacial que evita a coalescência. A outra é a formação de uma camada elétrica dupla, que constitui uma barreira para a aproximação das gotas, gerando uma estabilização eletrostática (Palla & Shah, 2002). A figura 2 abaixo ilustra essas considerações.

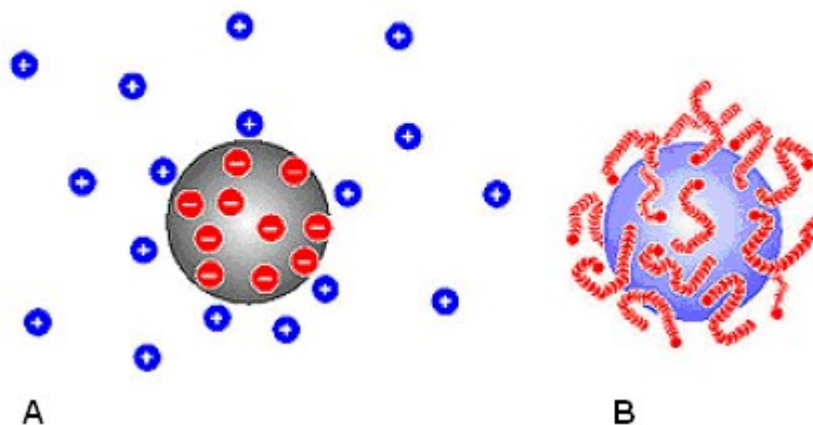


Figura 2: Processos de estabilização de emulsões. Na estabilização eletrostática (A), ocorre a adsorção de surfactantes aniônicos em torno da gota de óleo formando uma dupla camada, que é balanceada pelos contra-íons e na estabilização estérica (B), níveis altos de emulsificantes não iônicos e poliméricos induzem a estabilização principalmente pelos efeitos estéricos (Coutinho, 2009).

A estabilidade das emulsões está relacionada também com outros fatores como a idade da emulsão, a viscosidade da fase contínua, temperatura, pH, tipo de agente emulsificante, presença de sólidos, dureza da água e vários outros fatores que alterem as forças estabilizantes da emulsão (Manning & Thompson, 1995).

3.3.1 Desestabilização de emulsões

A quebra de emulsões, processo conhecido como de-emulsificação, envolve a desestabilização do sistema heterogêneo e culmina na separação de suas fases constituintes (Coutinho, 2009). Alguns fenômenos físicos podem ser observados quando isso ocorre. Primeiramente, a própria ação da gravidade e a diferença de densidade entre os líquidos podem promover a sedimentação das partículas emulsionadas. Outro processo que pode ocorrer é a floculação, que consiste na adesão reversível de gotículas ao filme interfacial, mantendo uma rede bidimensional, sem coalescência. Por fim, pode ocorrer a coalescência das gotas de óleo, com a formação de gotas maiores (Souza, 2003).

O tratamento químico consiste na utilização de eletrólitos que podem deslocar os surfactantes da interface óleo-água. Podem ser utilizados agentes catiônicos ou

aniônicos, sais monovalentes ou substâncias orgânicas polivalentes. Assim as gotículas de óleo presentes no meio se aproximam umas das outras e coalescem (Delcolle, 2005). Para alcançar a separação de fases na extração de óleo bruto e outros processos petroquímicos de-emulsificantes químicos, geralmente polímeros de alto peso molecular são amplamente empregados (Wang et al., 2004).

3.3.2 De-emulsificação microbiana

Estudos têm demonstrado a capacidade de alguns micro-organismos de modificar as propriedades das emulsões, seja por meio de suas superfícies celulares hidrofóbicas, ou pela produção de compostos ativos de superfície (Cairns et al., 1982), que podem desestabilizar as emulsões, pela capacidade de degradação ou transformação dos componentes oleosos emulsionados ou pela modificação do pH na interface da emulsão (Kosaric et al., 1987; Banat et al., 1995; Nadarajah et al., 2002).

Comparando-se os estudos de de-emulsificação por compostos químicos, a pesquisa com de-emulsificantes biológicos ainda é muito escassa. Os primeiros trabalhos publicados e até os atuais têm focado no papel das propriedades microbianas, especialmente a superfície celular, e poucos trabalhos tem investigado a produção de compostos extracelulares com propriedades de-emulsificantes, como os conduzidos por Janiyani (1994) e Li & Xu (2012).

Alguns micro-organismos em função de suas características de superfície, como carga e hidrofobicidade, podem apresentar afinidade tanto pela fase oleosa quanto pela fase aquosa. Assim, as células podem se ligar na interface óleo-água e facilitar a coalescência da fase dispersa (Duvnjak e Kosaric, 1987; Das, 2001; Nadarajah, 2001).

Em um estudo sobre de-emulsificantes microbianos, Kosaric e colaboradores (1982) investigaram as propriedades desestabilizantes de células de *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Arthrobacter*.

Nesse estudo, essas bactérias foram testadas quanto à capacidade de quebra de emulsões-modelo constituídas de querosene e água. Um capítulo desse trabalho foi dedicado à elaboração de um modelo que pudesse ilustrar o mecanismo por meio do qual as bactérias poderiam induzir a de-emulsificação e também a estabilização de uma emulsão. De acordo com os autores, se a superfície bacteriana for hidrofóbica ela pode ser significativamente molhada pela fase descontínua da emulsão, ocorrendo um “momento” em que o micro-organismo se encontraria em uma posição de equilíbrio na interface entre as fases contínua e descontínua, ficando com mais da metade de sua superfície submersa na fase descontínua. Se duas gotas desta fase entrarem em contato, molharem e se propagarem na superfície da bactéria, essas gotas poderiam coalescer (Figura 3A). De outro modo, se a superfície bacteriana for hidrofílica, não ocorrerá um “molhamento” significativo dessa superfície pela fase descontínua. Assim, as gotas desta fase podem atingir o equilíbrio antes da coalescência ocorrer, ocasionando a estabilidade da emulsão (Figura 3B).

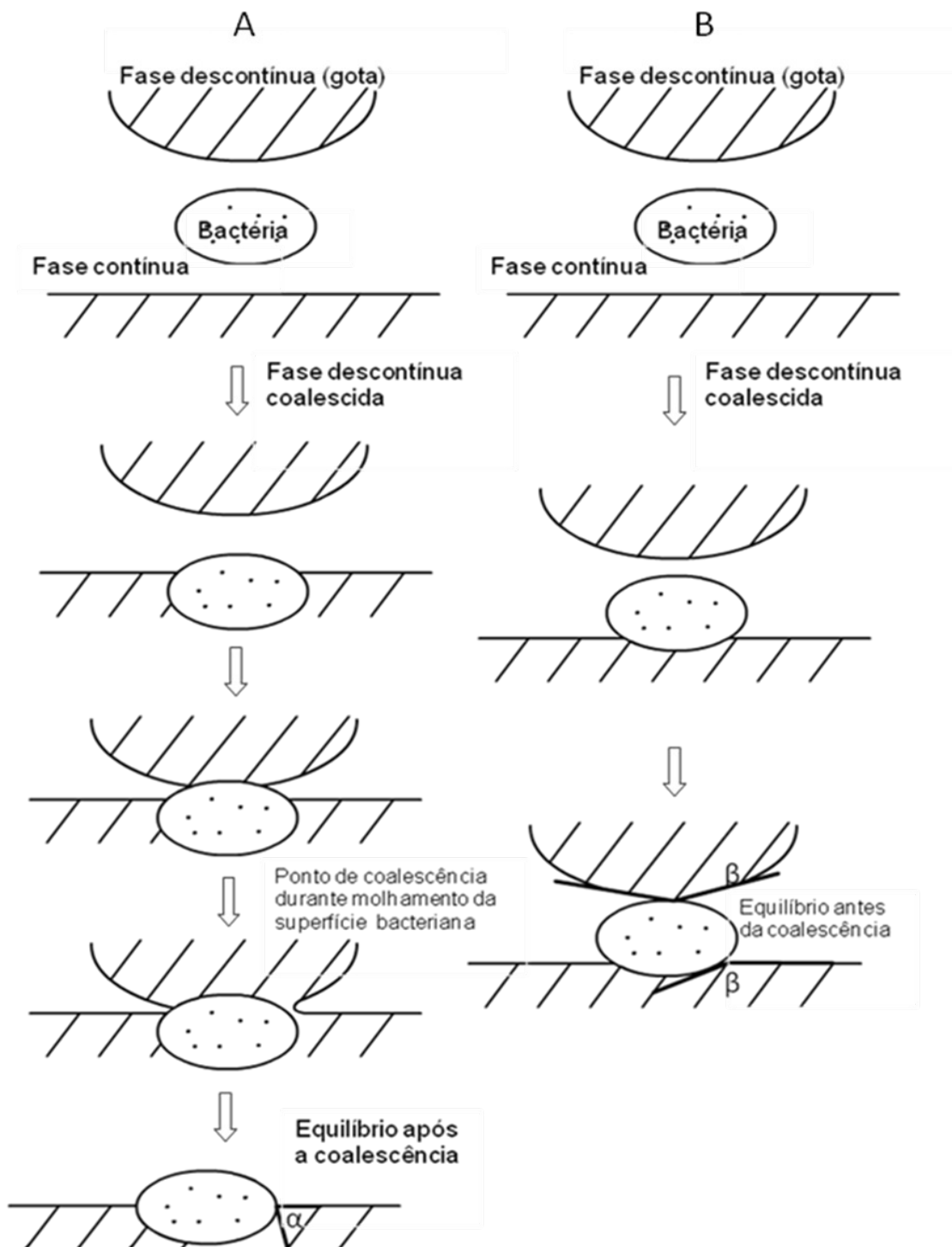


Figura 3: Esquema de como uma bactéria pode promover (A) ou inibir (B) a coalescência de emulsões. A ou B ocorrem dependendo de como a superfície bacteriana é efetivamente molhada pela fase descontinua da emulsão. A capacidade de molhar as superfícies celulares é determinada pelos ângulos de contato de equilíbrio (α e β) para uma emulsão A/O (Kosaric et al., 1982).

A medida quantitativa da capacidade de um líquido molhar um sólido é representada pelos ângulos de contato. Sua definição geométrica corresponde ao ângulo formado por um líquido na interseção da interface líquida, gasosa e sólida. Uma

gota de água depositada sobre a superfície de um sólido pode se espalhar uniformemente sobre toda a superfície sólida como quase um filme fino ou formar uma gota esférica sobre a superfície. No caso de o líquido formar um filme, o ângulo θ , será zero e o sólido será completamente molhado pelo líquido, ou seja, a sua superfície terá propriedades hidrofílicas. Quando $\theta > 0$, o sólido pode ser descrito como parcialmente molhado ou “molhante”, quando θ for menor ou igual a 30° e, entre 30° e 89° , como “parcialmente molhante”, e para valores iguais ou maiores que 90° , “não molhante” (Brissolari, 2008). A figura abaixo (4) representa esquematicamente o formato da gota sobre um sólido de acordo com os valores que o ângulo de contato (Θ) pode assumir e a relação com a capacidade de molhar a fase sólida.

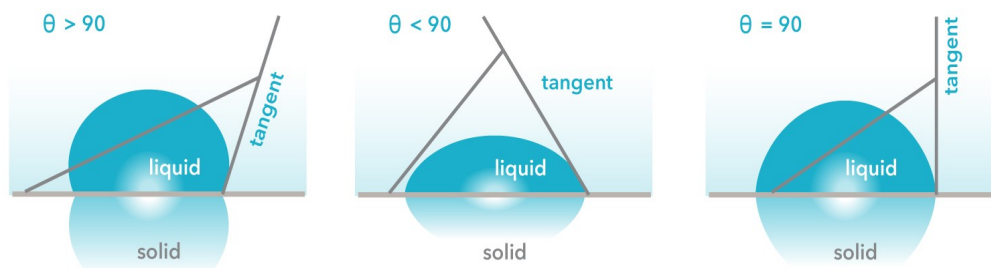


Figura 4: Nessa figura o ângulo de contato é representado pela letra Θ . Ângulos com baixos valores de Θ ($\Theta < 90$) indicam que o líquido espalha ou molha bem a superfície. Altos valores de Θ ($\Theta > 90$) indicam que o líquido não espalha bem. Quando $\Theta = 0$ pode-se dizer que ocorreu um “molhamento” completo. Por convenção da literatura esse ângulo é medido na fase aquosa (Shaw, 1992; Figura BiolinScientific).

A hidrofobicidade das células bacterianas também pode ser avaliada por meio da medida do ângulo de contato, que reflete a afinidade relativa entre a superfície sólida (bactéria) e as duas fases fluidas imiscíveis. Quando essas fases estão em contato com a superfície sólida, a configuração de equilíbrio delas depende dos valores relativos de tensão superficial (Silva, 2003; Coutinho, 2009).

Em um estudo conduzido por Cairns e colaboradores (1982), o ângulo de contato de *Nocardia amare* foi analisado após se observar uma redução significativa na estabilidade de emulsões A/O e O/A, formadas por diferentes fases orgânicas e agentes emulsificantes. O ângulo de contato das culturas na fase estacionária au-

mentou, refletindo um aumento da hidrofobicidade das superfícies celulares. Esse aumento pode ser relacionado com as altas taxas de quebra de emulsão naquela fase, e representa maior interação entre as células e as gotas de emulsão.

A propriedade anfipática dos CAS, produzidos por células microbianas, habilita esses compostos a promoverem o deslocamento e a alteração dos agentes emulsificantes presentes na interface água/óleo, levando à quebra da emulsão (Coutinho, 2009; Banat et al., 1995; Cairns et al., 1982; Kosaric et al., 1987). Alguns agentes produzidos biologicamente com as acetoínas, os polissacarídeos, os glicolipídeos, os fosfolipídeos e os ramnolipídeos possuem propriedades de-emulsificantes (Singh et al., 2007). A capacidade de-emulsificante pode ser proveniente, também, da degradação ou modificação microbiana dos componentes oleosos emulsionados, e ainda pela modificação do pH na interface.

O papel dos compostos ativos de superfície na desestabilização das emulsões reside no fato de possuírem atividade interfacial, podendo assim adsorver nas interfaces, induzindo a separação das fases constituintes da emulsão (Goldszal & Bourrel, 2000). Liu e colaboradores (2010), em um estudo da de-emulsificação biológica de emulsões A/O propõem que este processo ocorra nas seguintes etapas: adsorção do de-emulsificante na interface óleo/água, e a interação com os agentes emulsificantes, que resulta na remoção do filme rígido. A remoção do filme promove a coalescência das gotas de óleo, sendo que elas vão aumentando de tamanho e migrando para a outra fase.

3.3.2.1 Fatores que podem influenciar na de- emulsificação microbiana

A de-emulsificação microbiana pode ser influenciada por fatores biológicos e não biológicos. Os primeiros compreendem aqueles capazes de influenciar a superfície celular bacteriana como: o potencial genético espécie-específico, determinante da composição química da parede celular (características como caráter hidrofóbico e hidrofílico, carga); estado metabólico das células influenciando a expressão do potencial genético (organização física dos compostos químicos da parede na superfície celular; ligação de moléculas extracelulares ativas de superfície na superfície da célula, tais como metabólicos secundários secretados; produtos de au-

tólise celular e lipídeos extraídos de células por substratos orgânicos). Por sua vez, os fatores de origem não biológica influenciam as propriedades interfaciais e reológicas do sistema; são eles: a composição da fase orgânica, a composição da fase aquosa, a natureza dos surfactantes estabilizadores da emulsão, presença de partículas finas e a temperatura (Cairns et al, 1982; Cooper et al., 1982; Gray et al., 1984; Kosaric et al., 1987; Banat et al., 1995; Das, 2001; Nadarajah et al., 2001; Nadarajah et al., 2002; Coutinho, 2009) . Alguns fatores relacionados ao cultivo dos micro-organismos (disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio) também estão relacionados com a de-emulsificação microbiana.

Tem sido demonstrado que a idade da cultura e a concentração de células inoculadas em uma emulsão influenciam ativamente na taxa de de-emulsificação promovida por micro-organismos (Cooper et al., 1982; Kosaric et al., 1984; Das, 2001; Nadarajah et al., 2002).

Nadarajah e colaboradores (2002) avaliaram o potencial de-emulsificante de uma cultura bacteriana mista isolada de um local contaminado com petróleo. Os autores observaram um aumento na atividade de quebra da emulsão modelo querosene-água (70:30 v/v) com o aumento da idade e da concentração celular. O valor máximo de de-emulsificação foi observado para a cultura de 48 h. A atividade de de-emulsificação aumentou com o aumento no número de células, atingindo um valor máximo quando a cultura continha 10^8 UFC/mL. O efeito da quantidade de cultura bacteriana adicionada à emulsão foi avaliado separadamente. Após 24 h de incubação, 96 e 60% de de-emulsificação foram observados com 10 e 1% de cultura, respectivamente.

Efeito dos diferentes componentes da cultura

Nadarajah e colaboradores (2002) avaliaram a capacidade de de-emulsificação dos diferentes componentes de uma cultura mista individualmente, sendo eles meio com as bactérias cultivadas (cultura inteira), as células floculantes (células que não precipitaram com a centrifugação), as células do “pellet” lavadas e suspendidas com o meio original, o filtrado do sobrenadante (preparado pela passagem do sobrenadante por um filtro de $0,22\mu\text{m}$), o sobrenadante, as células do “pellet” e o meio não inoculado. A cultura inteira apresentou os maiores valores

de de-emulsificação, 83 a 90%, seguida das células floculantes, das células do pellet e das células lavadas (máximo de 55%), durante todo o período de crescimento avaliado. As células do pellet apresentaram taxas significantes de de-emulsificação somente após a cultura atingir 72 h de idade. O sobrenadante e o filtrado do sobrenadante não produziram nenhuma atividade de-emulsificante significativa, sugerindo que a atividade de de-emulsificação da cultura mista está predominantemente associada às células. As células do pellet lavadas e suspendidas em meio original apresentaram uma redução na atividade de de-emulsificação quando comparadas com as células do “pellet”; sugerindo que algum composto solúvel associado a célula com propriedade de-emulsificante pode ter sido perdida durante a lavagem das células.

Efeito do substrato de cultivo

Cairns e colaboradores (1982) analisaram a influência de dois meios de crescimento na atividade de de-emulsificação de *Nocardia amarae*. As células crescidas no primeiro meio mineral acrescido de substratos solúveis em água (1% extrato de levedura e 1% de dextrose) apresentaram taxas de de-emulsificação bem menores que o segundo meio adicionado de substrato insolúvel em água (4% de hexadecano).

Liu e colaboradores (2009) avaliaram a produção de um de-emulsificante por uma linhagem de *Dietzia* sp S-J-1 isolada de um solo contaminado com petróleo. Essa linhagem foi submetida a diferentes formas de cultivo, utilizando óleo de fritura e parafina como fonte de carbono. A cultura celular proveniente do cultivo em meio contendo óleo de fritura foi capaz de promover uma maior taxa de de-emulsificação para emulsões A/O, do que a obtida com o cultivo com parafina (88,3% contra 66,7%).

Em um outro trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, foi avaliada a otimização da produção de um demulsificante por uma linhagem de *Alcaligenes* sp S-XJ-1. Liu e colaboradores (2010) utilizaram a ferramenta Análise de Superfície de Resposta para otimizar a produção do composto demulsificante, combinando diferentes concentrações de fonte de carbono (hidrofílicas e hidrofóbicas), fontes de nitrogênio e valores de pH. O estudo mostrou que a parafina favoreceu a síntese

se de um de-emulsificante associado à parede celular. O citrato de amônio estimulou a produção e a performance do de-emulsificante e o pH de 9,5 favoreceu o crescimento e a habilidade em quebrar a emulsão A/O.

Efeito de tratamentos físicos e químicos das culturas microbianas

Alguns tratamentos das culturas microbianas como calor úmido sob pressão (121 °C), resfriamento rápido, congelamento e liofilização podem afetar a atividade de de-emulsificação celular. Nadarajah e colaboradores (2002) observaram que o congelamento e o resfriamento rápido (nitrogênio líquido ou estoque a -20°C por 24 h) de uma cultura mista isolada de local contaminado com petróleo não influenciaram a atividade de-emulsificante dessas culturas. A utilização de culturas liofilizadas reduziram as taxas de de-emulsificação em 56%. O calor úmido sob pressão (121° por 20 min) destruiu totalmente a capacidade de de-emulsificação da cultura, sugerindo o caráter termo lábil do fator responsável pela de-emulsificação.

3.4 Seleção de micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície

Considerando o interesse e o potencial de aplicação dos micro-organismos no tratamento de resíduos industriais, a busca por novos micro-organismos produtores de CAS é de grande relevância. Atualmente existem poucos compostos biológicos tensoativos disponíveis comercialmente, como a surfactina, os soforolipídeos e os ramnolipídeos (Walter et al., 2010).

Existe um número elevado de métodos laboratoriais para selecionar micro-organismos produtores de compostos ativos de superfície (CAS). Somado a isso, estão as metodologias que buscam caracterizar essas moléculas e medir a eficiência de sua atividade de superfície. De acordo com Chen e colaboradores (2007), os métodos utilizados na avaliação inicial da produção de CAS se baseiam em três princípios básicos, quais sejam: a habilidade em identificar organismos produtores dessas moléculas; a habilidade em obter dados quantitativos da eficiência dos CAS e a habilidade em selecionar muitos isolados em pouco tempo.

A etapa inicial desta seleção consiste no isolamento de micro-organismos capazes de crescimento em meios de cultivo adicionados de hidrocarbonetos como fonte principal de carbono, seguida da avaliação de suas características de superfície. Devido à grande diversidade bioquímica desses compostos, muitos desses métodos de busca são baseados nos efeitos físicos dos CAS. Como exemplo, pode-se citar a medida da atividade de superfície e interfacial, que avalia a redução da tensão superficial da água, na presença de surfactantes biológicos. Outros métodos indicam, indiretamente, a produção de agentes de superfície, como os testes de “espalhamento” da gota de óleo, que consiste em se adicionar o sobrenadante de uma cultura, possivelmente produtora de CAS, sobre uma camada de óleo. Se ela se espalha, tem-se um indício da produção de agentes tensoativos (Walter et al., 2010). Outros ensaios podem avaliar a capacidade hemolítica de culturas microbianas, devido à presença dos CAS. Um teste utilizado é a hemólise em Agar suplementado com sangue. O teste em placa utilizando o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) é um teste semiquantitativo para a detecção de glicolípídeos ou surfactantes aniônicos. O princípio desse ensaio consiste na precipitação do azul de metileno na presença dos surfactantes microbianos (Walter et al., 2010).

Outra questão importante consiste na escolha do local a ser utilizado como fonte de micro-organismos potencialmente produtores de CAS. Micro-organismos com habilidade em utilizar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e energia podem ser encontrados em áreas poluídas ou áreas que não tiveram contato prévio com esses poluentes. A quantidade de microrganismos, porém, que apresentam essa habilidade geralmente é maior no local que foi impactado (Morais, 2005).

Com base nas considerações sobre o papel dos compostos ativos de superfície e sua importância para o metabolismo microbiano de hidrocarbonetos, o isolamento de micro-organismos presentes nas biopilhas de decomposição contendo derivados do petróleo, é uma estratégia interessante, já que os CAS são utilizados para aumentar a disponibilidade de muitos dos compostos encontrados nesses sistemas.

A remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo pode ser

realizada envolvendo três estratégias: a destruição ou alteração dos contaminantes, a extração ou separação dos contaminantes do local ou a imobilização dos contaminantes. Elas podem ser empregadas em conjunto ou separadamente. As tecnologias capazes de destruir os contaminantes ou alterar sua estrutura química compreendem métodos térmicos, biológicos e químicos. Esses métodos podem ser aplicados “in situ” ou “ex-situ”. No primeiro, a remediação é feita no próprio meio contaminado, sem que o solo seja retirado do ambiente. No caso das técnicas “ex-situ”, o solo é escavado, para ser tratado em uma instalação de depuração específica no local da contaminação ou fora dele (Seabra, 2005).

O sistema de biopilhas é uma técnica de biorremediação “ex situ”, na qual pilhas de solo contaminado são construídas com o objetivo de aumentar a biodegradação dos poluentes. O material a ser degradado é empilhado, juntamente são adicionados nutrientes e ar. Elas podem ser estáticas com canos de aeração instalados, ou podem ser revolvidas ou misturadas por dispositivos mecânicos. Os agentes estruturantes (geralmente madeiras em decomposição) podem ser adicionados para auxiliar a difusão de gases e aumentar a permeabilidade do solo. As biopilhas podem ser cobertas por mantas impermeáveis para evitar o escape de poluentes voláteis, além de fornecer proteção contra chuva e os ventos ou serem montadas em um local coberto (Seabra, 2005; Morais, 2005; Jørgensen et al., 2000).

As biopilhas quando comparadas às tecnologias “in situ”, apresentam a vantagem da facilidade da manipulação dos fatores ambientais que influenciam a biodegradação do poluente (Schoefs et al., 1998). Além disso, as biopilhas de solo poluído são construídas sobre uma base impermeável evitando a lixiviação do contaminante e conseqüente poluição das águas subterrâneas. Condições ambientais como concentração de oxigênio, umidade, concentração de nutrientes e pH são controlados para aumentar a atividade da comunidade microbiana (Kodres, 1999). Jørgensen e colaboradores (2000) relataram que a adição de matéria orgânica é interessante, já que solos contaminados são escassos desses compostos. Esta adição pode resultar no aumento da atividade microbiana, e conseqüentemente no aumento da taxa de degradação dos compostos orgânicos.

A avaliação de padrões de utilização de fontes de carbono pelos microrganismos

do solo possibilita o estudo do potencial metabólico da comunidade microbiana. Dessa forma, este potencial pode expor diferenças quanto ao padrão de utilização de substratos das comunidades microbianas ali presentes (Paula, 2008).

A diversidade metabólica alta é um parâmetro importante utilizado em estudos de prospecção de moléculas biológicas. Dentre as metodologias existentes para estudos do potencial metabólico, uma das mais empregadas envolve o inóculo de suspensões de solo em placas Ecoplate, da empresa Biolog (BIOLOG Inc., HAYWARD, CA.), contendo 31 diferentes fontes de carbono (Tabela 1). A utilização da fonte de carbono é facilmente detectada através da presença de um indicador, ocorrendo uma mudança de coloração quando um substrato é utilizado pelo microrganismo durante o processo de respiração. As informações podem ser analisadas automaticamente e podem ser comparadas em um banco de dados.

Embora alguns trabalhos já tenham discutido as limitações do método (Preston-Mafham et al., 2002), bem como as precauções a serem tomadas com relação à densidade de inóculo inicial, ao tempo e à temperatura de incubação das placas (Classen et al., 2003), a análise do padrão de consumo de substratos pela comunidade microbiana tem fornecido informações úteis na avaliação da diversidade funcional de microrganismos em amostras ambientais (Crechio et al., 2004).

Tabela 1: Fontes de carbono contidas nas microplacas Biolog Ecoplates®. Categorização dos substratos de carbono sugerida por Dobranic & Zak (1999).

Categoria	Nome da fonte de carbono
Polímero	Glicogênio
	Tween 40
	Tween 80
Carboidrato	α -Ciclodextrina
	D-Celobiose
	i-Eritritol
	α -D-Lactose
	β -Metil-D-Glicosídeo
	D-Xilose
	D-Manitol
Ácido Carboxílico	N-Acetil-D-glicosamina
	Ácido D-Galacturônico γ -Lactona
	Ácido γ -Hidroxi-butírico
	Ácido Itacônico
	Ácido α -Cetobutírico
	Ácido-D-Glicosamínico
	Ácido D-Galacturônico
	Ácido D-Málico
	Ácido 2-Hidroxi-benzóico
	Ácido 4-Hidroxi-benzóico
Aminoácido	L-Serina
	L-Arginina
	L-Asparagina
	L-Fenilalanina
	L-Treonina
	Ácido Glicil-L-glutâmico
Amina/Amida	Feniletilanina
	Putrescina
Miscelânea	D,L- α -Glicerol fosfato
	Glicose-1-fosfato
	Éster Metílico do Ácido Pirúvico

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Isolamento, identificação e seleção de bactérias produtoras de compostos ativos de superfície, a partir de biopilhas de compostagem de resíduos oleosos.

4.2 Específicos

-Caracterizar as biopilhas de compostagem quanto à população de bactérias heterotróficas totais e degradadoras dos compostos, óleo diesel, hexadecano e óleo DAIDO-DAIROL PA-5A, pela técnica de Número Mais Provável.

-Avaliar a diversidade metabólica da comunidade presente nas biopilhas de acordo com o padrão de consumo de fontes de carbono utilizando o sistema Biolog-E-COPLATE.

- Isolar e selecionar bactérias capazes de crescerem em meios adicionados de óleo diesel, hexadecano e óleo lubrificante, utilizando os métodos de enriquecimento e flotação.

- Avaliar os isolados obtidos quanto ao potencial de produção de compostos emulsificantes e surfactantes em meios adicionados de diferentes fontes de carbono.

- Testar alguns isolados produtores de compostos ativos de superfície quanto à capacidade de quebrar emulsões água em óleo (A/O).

- Caracterizar os isolados que quebram emulsões quanto à hidrofobicidade celular, avaliada indiretamente pelo método de adesão à hidrocarbonetos.

-Identificar os isolados produtores de CAS por métodos moleculares.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de um sistema de tratamento de resíduos oleosos, que consiste de biopilhas contendo material proveniente de uma indústria têxtil, pano sujo de óleo e graxa, matéria orgânica e cinzas de caldeira. A amostragem foi realizada coletando-se 3 sub-amostras de uma biopilha com 30, 60 e 90 dias de decomposição dos resíduos. As amostras foram processadas em um período de 24 h.

5.2 Determinação da população heterotrófica total e degradadora de compostos hidrofóbicos.

5.2.1 Determinação da população heterotrófica total

A população microbiana heterotrófica total foi determinada por meio da contagem de colônias obtidas no plaqueamento direto das amostras e pela determinação do número mais provável (NMP/g). Para o plaqueamento direto, as amostras foram diluídas serialmente em uma solução salina estéril (NaCl a 0,85%), e alíquotas de 100 µL das diluições de 10^{-1} a 10^{-7} foram espalhadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido, contendo por litro: 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 5 g de extrato de levedura e 20 g de ágar.

A determinação do NMP/g foi realizada como descrito por Ruggeri e colaboradores (2009). Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 180 µL de meio LB líquido, 20 µL de diluições seriadas das amostras 10^{-1} a 10^{-7} , sendo que cada diluição foi inoculada em quatro poços. A placa foi incubada por 7 dias a 32 °C. Ao final desse período acrescentou-se aos poços 50 µL de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (3g L^{-1}). Após 24 h, foi feita a leitura da absorbância a 485 nm e a observação de uma coloração rosa nos poços, indicativa do crescimento microbiano. O software da Microsoft Excel associado às equações descritas em Brionnes e colaboradores (1999) foram utilizados para calcular o NMP/g das amostras. O valor do NMP é calculado pela equação:

$$a_1 p_1 / 1 - e^{-a_1 x} + a_n p_n / 1 - e^{-a_n x} = a_1 n_1 + a_n n_n$$

onde a é o volume inoculado no poço, p , o número de poços positivos, e n , o

número de poços inoculados.

5.2.2 Determinação da população microbiana degradadora de compostos hidrofóbicos (óleo diesel, hexadecano e óleo DAIDO-DAIROL PA-5A) (Wrenn & Venosa, 1996)

Para avaliar a população microbiana das amostras com potencial para degradar diferentes compostos hidrofóbicos, foi montado um experimento em placas de 96 poços. As diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} foram adicionadas aos poços contendo Meio Mineral para bactérias (MMB), contendo por litro: 1,5 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de NaCl; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 3,0 g de NH_4NO_3 ; 0,002 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,002 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 0,02% de extrato de levedura e 5 mL de solução de elementos traços ($mg L^{-1}$ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,6; $CaCl_2 \cdot V$, 2,6; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 6) e 1% de óleo diesel, n-hexadecano, e óleo lubrificante DAIDO-DAROL PA5A, cada composto em diferentes placas. As placas foram incubadas por duas semanas a 32 °C. Ao final deste período, acrescentou-se aos poços 50 μL de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ($3g L^{-1}$), seguida de incubação adicional por mais 24 h. Após este período, foi feita a leitura dos poços a 485 nm e a observação de uma coloração rosa nos poços, indicativa do crescimento microbiano. A quantificação da população degradadora foi expressa em NMP/mL conforme descrito no item anterior.

5.3 Avaliação da diversidade metabólica da comunidade cultivável presente nas biopilhas utilizando o sistema ECOPLATE-Biolog

Para a avaliação do perfil de consumo de fontes de carbono dos micro-organismos presentes nas amostras, foi utilizado o kit Ecoplate® da empresa BIOLOG (Biolog, Hayward, CA, USA). Cada placa continha 31 fontes de carbono, em triplicata, totalizando 96 poços por placa e um controle sem fonte de carbono. Uma alíquota de 120 μL de suspensão do solo diluída correspondente a uma concentração em torno de 10^3 células/ mL foi injetada em cada um dos 96 poços, com o auxílio de uma pipeta multicanal. As placas foram incubadas a 28°C e analisadas com 24h, 48h e 72h de incubação em um leitor automático de microplacas a 490 nm. A densidade óptica foi corrigida pelo branco para cada leitura e, em seguida, corrigido para a primeira leitura feita logo após a inoculação

das placas.

5.3.1 Determinação do Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM), dos índices de diversidade de Shanon, riqueza e equitabilidade do consumo dos substratos presentes nas placas Biolog-ECOPLATE pelas biopilhas de 30, 60 e 90 dias.

O Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) para cada fonte de carbono foi calculado de acordo com Garland (1996). O Índice de Diversidade de Shannon (H), que compreende tanto a riqueza de substratos como a intensidade com que são usados pela microbiota foi calculada de acordo com Zak et al.(1994), utilizando a equação:

$$H = -\sum p_i (\ln p_i)$$

Onde, p_i é a razão entre a atividade de utilização de determinado substrato e a atividade de utilização de todos substratos.

A riqueza de substratos (S) foi determinada através do número total de substratos utilizados (MHM>0) pela comunidade microbiana do solo. A equitabilidade de substratos (E), que mede a uniformidade de utilização de um substrato em relação ao número de substratos utilizados pela microbiota, foi calculada de acordo com a equação:

$$E = H / \ln S$$

Onde, S é o número de substratos utilizados e H é o índice de diversidade de Shannon.

6 Isolamento de bactérias degradadoras de compostos hidrofóbios (hexadecano, óleo diesel e óleo Daido-Dairol PA-5A) pelo método de enriquecimento e seleção de superfícies hidrofóbicas

6.1 Isolamento pela técnica de enriquecimento

As amostras descritas anteriormente foram inoculadas em meio MMB em diferentes frascos Erlenmeyer, contendo óleo diesel, ou n-hexadecano ou óleo Daido-Dairol PA5A a 1% (v/v). Os frascos foram incubados em agitador orbital por até 7 dias. Após este período, alíquotas das culturas foram novamente

transferidas para um novo meio de cultura, contendo os mesmos compostos, e submetidas por mais um período de incubação por 7 dias. Por fim, este procedimento foi repetido por mais uma vez. Após as três passagens, alíquotas foram diluídas serialmente, e plaqueadas em meio MMB sólido, acrescido dos mesmos compostos a 1% v/v. Os isolados obtidos foram purificados em meio LB.

6.2 Isolamento de bactérias pelo método de seleção de superfícies hidrofóbicas

Como mais um método de isolamento foi utilizado o protocolo proposto por Satow e colaboradores (2008) com modificações. 20 g das amostras sólidas de solo foram adicionadas a frascos Erlenmeyer contendo salina e cicloheximida a 500 µg/mL. A mistura foi homogeneizada, e os frascos Erlenmeyer incubados a 22 °C por 30 minutos. Após esse período, acrescentou-se 20 mL de óleo mineral, seguidos de agitação orbital, a 200 rpm por 5 minutos. Os frascos foram mantidos em repouso por 20 minutos. Alíquotas da interface óleo/salina foram plaqueadas em meio LB sólido e incubadas a 37 °C por uma semana. As colônias isoladas foram purificadas no mesmo meio.

Para a manutenção das culturas em estoques, as bactérias foram cultivadas em caldo LB por 24h, quando alíquotas de 0,8 mL foram transferidas para tubos criogênicos de 1,5 mL estéreis, adicionados de 200 µL de glicerol. Os tubos foram mergulhados em nitrogênio líquido para o congelamento rápido das amostras e armazenados a -80 °C.

7 Seleção de linhagens produtoras de compostos ativos de superfície

Todos os isolados obtidos por meio do método de enriquecimento e seleção de bactérias com superfícies hidrofóbicas foram submetidos a testes qualitativos e quantitativos para verificar a produção de compostos ativos de superfície, e serem utilizados na quebra e formação de emulsões oleosas.

7.1 Preparo do inóculo

Para a realização dos ensaios, os isolados foram reativados por meio do

crescimento em placas de meio LB a 37 °C. Após observação de crescimento, as colônias foram retiradas da placa com o auxílio de uma alça de platina, e acrescentadas em tubos contendo 1mL de água destilada, até a suspensão atingir 2 unidades na escala de McFarland.

Alíquotas de 200 µL da suspensão celular foram adicionadas à frascos de vidro de 50 mL, contendo 20 mL MMB acrescido das seguintes fontes de carbono: óleo diesel, hexadecano e glicose a 1% v/v. Cada isolado foi inoculado em cada uma das fontes de carbono, em duplicata. Os frascos foram incubados à 37 °C, em agitador orbital a 200 rpm por uma semana. Ao final do período de incubação, as culturas tiveram sua densidade ótica a 600 nm determinada, e posteriormente foram centrifugadas para a realização dos testes de produção de CAS, com as frações da cultura, células e sobrenadantes.

7.2 Formação de Halos de hemólise em placas de ágar-sangue e halos em placas contendo CTAB-azul de metileno

Foram preparadas suspensões celulares de 0,1 unidade de densidade ótica a 600 nm, para a inoculação de 10 µL na superfície de meio ágar nutriente contendo 5% v/v de sangue de carneiro. As alíquotas de diferentes culturas foram dispostas entre si por uma distância de pelo menos 2 cm, segundo método proposto por Carrilo e colaboradores (1996) com modificações. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e analisadas quanto ao aparecimento de halos claros em torno das colônias, indicativo da produção de moléculas ativas de superfície.

A mesma suspensão celular foi utilizada para a realização do ensaio semiquantitativo descrito por Siegmund & Wagner (1991), com modificações. Foram dispostos 10 µL da suspensão de bactérias em meio sólido, contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) com o corante azul de metileno, preparados pela adição de 0,2 g de CTAB (Merck) e 0,05 g de azul de metileno e 15 g de ágar em 1L de MMB. Em seguida as placas foram incubadas a 30 °C por 120 h, seguidas da incubação em geladeira por mais 48h. Após este período de incubação, as placas foram analisadas quanto ao aparecimento de halos escuros ao redor das colônias.

7.3 Avaliação da atividade surfactante e emulsificante

O sobrenadante obtido com a centrifugação das culturas, descrita no item 7.1, foi avaliado quanto à atividade emulsificante e surfactante.

7.3.1 Método da atividade emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada pelo método do índice de emulsificação descrito por Cameron e colaboradores (1988). Alíquotas de 1 mL do sobrenadante da cultura foram adicionados a tubos contendo 1,5 mL de querosene. Cada tubo foi homogeneizado em agitador do tipo Vórtex em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h. O índice de emulsificação foi determinado dividindo-se a altura da camada de emulsão (cm) pela altura da camada total do líquido. O valor obtido foi multiplicado por 100 (Equação 1). Cada ensaio foi realizado em duplicata.

$$E_{24} = \frac{\text{Altura da camada emulsionada}}{\text{Altura total do líquido}} \times 100 \%$$

Equação 1: Equação de determinação do Índice de emulsificação (E_{24}) expresso em porcentagem.

7.3.2 Método da atividade surfactante

A atividade surfactante foi determinada pelo método do diâmetro da gota descrito por Morita e colaboradores (2007) com modificações. Quatro alíquotas de 10 µL de cada sobrenadante de cultura livre de células foram transferidas com uma micropipeta para a superfície interna de placas de poliestireno (90 x 10 mm) posicionadas sobre um papel milimetrado. Após 10 min em repouso à temperatura ambiente, as placas foram fotografadas com uma câmera fotográfica digital e o diâmetro das gotas foi medido posteriormente no monitor do computador utilizando o papel milimetrado ao fundo como referência. O controle negativo consistiu do meio de cultura estéril.

7.4 Testes de quebra de emulsão modelo

7.4.1 Preparo das emulsões

A avaliação do potencial de de-emulsificação dos isolados obtidos que apresentaram atividade de hemólise foi determinada pela inoculação das culturas em uma emulsão modelo (A/O). A emulsão modelo foi obtida pela mistura de 1 mL de solução aquosa de Span 80 a 1,67% p/v (Merck) e 1 mL de querosene comercial (Ica), de acordo com Liu e colaboradores (2009). A mistura foi homogeneizada em agitador tipo Turrax (Marconi), a uma velocidade de 24.000 rpm por 2 minutos até a obtenção de emulsão estável e homogênea.

7.4.2 Avaliação da atividade de de-emulsificação

A atividade de-emulsificante dos isolados bacterianos foi avaliada adicionando-se 300 µL do sobrenadante da cultura às emulsões distribuídas em tubos de 14,8 x 100 mm e vedados com rolhas de silicone. Os tubos foram agitados em agitador do tipo vórtex (Phoenix) por 30 s na velocidade de 3.800 rpm. A seguir, a de-emulsificação foi avaliada após 7 dias de incubação, e expressa como porcentagem de de-emulsificação por meio da fórmula (Equação 2):

$$\% \text{ De-emulsificação} = \frac{V_0 \text{ da emulsão (mL)} - V_f \text{ da emulsão na interfase (mL)}}{V_0 \text{ da emulsão (mL)}} \times 100\%$$

Onde, V_0 corresponde ao volume inicial e V_f ao volume final da emulsão.

Equação 2: Equação para o cálculo da de-emulsificação expressa em porcentagem

7.4.3 Hidrofobicidade celular (Teste de adesão microbiana à hidrocarbonetos MATH)

Para determinar a hidrofobicidade da superfície celular dos isolados avaliados quanto à quebra de emulsão, foi utilizado o ensaio de adesão microbiana a hidrocarbonetos proposto por Rosemberg (1991), com modificações. As células foram lavadas e suspendidas em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7), de

forma a obter a concentração final de 0,7 unidade de densidade ótica a 600 nm. Alíquotas de 2 mL da suspensão celular e de 0,5 mL de hexadecano foram misturadas e agitadas em vórtex (Phoenix) na velocidade de 2800 rpm por 60 segundos. Após 30 minutos de repouso, amostras da fase aquosa foram removidas e submetidas à determinação da densidade ótica a 600 nm (DO final) e a hidrofobicidade foi estimada pelo cálculo da porcentagem de células aderidas ao hexadecano, por meio da fórmula (Equação 3):

$$100 \times [1 - (\text{DO}_{600} \text{ após a mistura} / \text{DO}_{600} \text{ antes da mistura})].$$

Equação 3: Adesão ao hexadecano expressa em porcentagem

8 Identificação dos isolados

Os morfotipos que apresentaram atividade tensoativa foram identificados a partir de características macro e micro morfológicas, a reatividade à coloração de Gram, e também pelo sequenciamento de regiões do rDNA 16S.

8.1 Extração de DNA Genômico

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi realizada conforme protocolo proposto por Pitcher e colaboradores (1989), com modificações. Foi utilizada uma cultura pura bacteriana cultivada em meio LB líquido, mantida sob agitação orbital de 150 rpm à temperatura ambiente durante 24 h. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. O precipitado de células foi lavado com 200 µL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 0,01M pH 8,0 e EDTA 0,001M) adicionado de lisozima 2 mg/mL. Foram adicionadas aos tubos cônicos pérolas de vidro (0,03 g). As amostras foram agitadas em vórtex, até se observar a diminuição na turbidez dos tubos. Após esse procedimento, os tubos foram incubados por 2h a 37 °C. Então, adicionou-se 500 µL de uma solução contendo tiocianato de guanidina a 5M, EDTA 100 mM, pH 8 e n-lauril-sarcosil a 0,5%. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Ao final, a suspensão foi resfriada em gelo e adicionou-se 250 µL de acetato de amônio a 7,5 M. Os tubos foram agitados por inversão e incubados em gelo por 10 minutos. A desproteinização foi obtida após o tratamento do sobrenadante com uma

solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. À fase aquosa obtida foi adicionado igual volume de isopropanol, com posterior agitação suave e incubação a -20 °C por 12 h. Os ácidos nucleicos foram precipitados por centrifugação a 14.000 rpm durante 10 min. O precipitado obtido foi então lavado duas vezes com etanol 70 % e após a secagem em estufa, foi suspenso em 100 µL de água Milli-Q estéril. As concentrações de DNA e proteínas foram determinadas em Nanodrop e a integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose à 0,8 % (p/v).

8.2 Amplificação de sequências do rDNA 16 S

A amplificação das sequências de rDNA 16S, foi realizada com os iniciadores 8F (5'-GGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT) para bactérias (Heuer et al., 1997). A região amplificada por este par de iniciadores abrange 3 regiões variáveis, V6 a V8, do rDNA 16S. A amplificação foi realizada em volume total de 50 µL contendo KCl 10mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador, 50 a 300 ng de DNA e 1,25 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi feita em termociclador (Amersham-Biosciences), promovendo a desnaturação a 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min. Após o último ciclo, os tubos foram incubados a 72°C por 10 min, seguido de resfriamento a 4°C.

8.3 Sequenciamento

Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando polietilenoglicol (PEG 8000). O produto de PCR (45 µL) foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, e 45 µL da solução de PEG (PEG 8000 20%, NaCl 2,5M) foi adicionada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C e centrifugada posteriormente a 13.500 rpm por 20 minutos sob refrigeração. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com 200 µL de etanol 80% gelado, deixando-se incubar por 1 minuto antes da centrifugação por 2 minutos a 13.500 rpm sob refrigeração. Após evaporação do etanol à temperatura ambiente, o

sedimento foi suspenso em 8 µL de água Milli-Q. O DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm para estimar as concentrações necessárias a serem utilizadas na reação de sequenciamento. As reações foram realizadas utilizando o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. As sequências foram analisadas utilizando o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão do BLAST 2.0 (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), para a comparação com as sequências depositadas no GenBank. Para ser considerado pertencente a uma espécie, o isolado deverá apresentar similaridade de 99% a outra já depositada no GenBank.

9 Análises estatísticas

Os dados obtidos da análise das microplacas Biolog-Ecoplate (Índices de Diversidade Metabólica, e Desenvolvimento Médio da Cor) foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$). As comparações de médias foram feitas através do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SISVAR.

Os demais experimentos foram realizados em duplicatas (crescimento, atividade emulsificante, quebra de emulsão e adesão microbiana à hidrocarbonetos), ou quadruplicatas (atividade surfactante), e os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott considerando $p \leq 0,05$.

10 Resultados e discussão

10.1 Análise dos isolados bacterianos cultiváveis em biopilhas de tratamento de resíduos oleosos obtidos pelo plaqueamento direto

Os morfotipos obtidos com o plaqueamento direto em meio LB foram diferenciados, considerando-se a coloração da colônia, o aspecto da borda e a presença/ausência de rugosidades na superfície colonial. A coloração de Gram foi realizada para verificar a pureza dos isolados e caracterizá-los quanto à morfologia celular e o tipo de reatividade à esta coloração. Para a biopilha de 30 dias, foi obtido um total de 25 morfotipos. Já na biopilha de 60 e 90 dias, foram obtidos 32 e 39 morfotipos, respectivamente. A descrição do aspecto colonial, arranjo das células, e os valores de UFC/g dos morfotipos estão apresentados na Tabela 2.

Foi observado um aumento na densidade microbiana com o aumento da idade da biopilha. A biopilha de 30 dias apresentou os menores valores de densidade populacional ($19,4 \times 10^6$) seguido pela de 60 ($47,3 \times 10^6$) e 90 dias ($24,8 \times 10^7$). Resultados de alteração da microbiota ao longo da compostagem em biopilhas têm sido relatados. Lors e colaboradores (2010) estudaram a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no sistema de biopilhas e a densidade de micro-organismos heterotróficos totais. Foi observada uma alta densidade populacional, da ordem de 10^8 UFC/g de solo no sistema contaminado com fluoranteno e fenantreno. Nos tempos de 30 e 60 dias de compostagem, a população heterotrófica aumentou cerca de 2,4 vezes e em torno de 5,2 vezes ao final de 90 dias de compostagem. Já Jorgensen e colaboradores (2000) contabilizaram um número de bactérias heterotróficas totais da ordem de $8,2 \times 10^7$ UFC/g de solo em um estudo de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos utilizando o sistema de biopilhas.

Comparando-se as biopilhas em todas as idades, houve a predominância de isolados Gram positivos em relação aos Gram negativos. Na biopilha de 30 dias, foram isolados 23 bastonetes Gram positivos, 1 bastonete e 1 coco Gram negativos. Já na biopilha de 60 dias, dos 32 isolados obtidos, 31 eram bastonetes Gram positivos, e apenas 1 bastonete Gram negativo. Na biopilha de 90 dias, do total de 39 isolados, 36 eram bastonetes Gram positivos, 2 bastonetes Gram

negativos e 1 cocobacilo Gram negativo. A maioria das células não apresentou arranjo. Somente 2 isolados apresentaram arranjos celulares em cadeias (30211 e 9038). Os trabalhos que investigam a diversidade de micro-organismos envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos em sistemas de biopilha e compostagem revelam a presença de micro-organismos tanto Gram positivos como Gram negativos, dependendo do tipo de composto químico contaminante, solo, dentre outros parâmetros. Ros e colaboradores (2010) observaram a predominância de bactérias Gram positivas, cerca de 53%, pertencentes ao filo *Actinobacteria*, em relação ao filo *Proteobacteria* (20%) composto por organismos Gram negativos, em um estudo com lodos contaminados com hidrocarbonetos.

Tabela 2: Descrição colonial, morfológica, arranjo e densidade dos isolados provenientes das biopilhas de tratamento de resíduos oleosos de diferentes idades.

Idade da biopilha	Morfotipo	Densidade (UFC/g)	Descrição das colônias	Morfologia celular e reação tintorial de Gram
Biopilha 30	3011	56x10 ⁴	creme, opaca, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
	3012	22x10 ⁴	transparente, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3013	3,5x10 ⁴	creme, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3014	2,5x10 ⁴	amarela, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3015	2x10 ⁴	creme, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3016	0,5x10 ⁴	rosa, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3017	3x10 ⁴	creme, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3018	3,5x10 ⁴	amarela, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3019	0,5x10 ⁴	creme, opaca, borda lisa, aveludada, elevada	bastonete, com esporos, G+
	3023	13,5x10 ⁵	creme, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3025	3x10 ⁵	creme, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3026	2,5x10 ⁵	rosa, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3027	10 ⁵	creme, opaca, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
	30211	3x10 ⁵	creme, opaca, borda irregular	bastonete longo em cadeia, G-
	30212	2,5x10 ⁵	transparente, opaca, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
	30213	0,5x10 ⁵	amarela, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	30214	3,5x10 ⁵	creme, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	30215	10,5x10 ⁵	creme, brilhante, borda lisa	Coco, G-
	3032	82x10 ⁵	transparente, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3034	11,5x10 ⁵	amarela, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3036	14,5x10 ⁵	rosa, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	3037	10,5x10 ⁵	creme, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	30316	24,5x10 ⁵	transparente, centro rosa, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	30317	0,5x10 ⁵	creme, opaca, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
30318	1,5x10 ⁵	transparente, brilhante, borda	bastonete, com	

		irregular		esporos, G+
Total	Número de morfotipos	25		
Biopilha 60	6011	12,5x10 ⁵	transparente, centro branco, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6012	19,5x10 ⁵	transparente, borda irregular, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6013	0,5x10 ⁵	creme, borda irregular, fosca	bastonete G-
	6014	7x10 ⁵	transparente, amarelada, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6015	5x10 ⁵	transparente, laranja, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6016	1,5x10 ⁵	transparente, rosa, borda lisa, brilhante	bastonete com esporos, G+
	6017	0,5x10 ⁵	creme, borda irregular, fosca	bastonete G-
	6018	6x10 ⁵	amarela, fosca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	6019	58,5x10 ⁵	transparente, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6021	7,5x10 ⁵	transparente, centro branco, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6022	3x10 ⁵	transparente, borda irregular, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6024	4x10 ⁵	transparente, amarelada, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6025	2,5x10 ⁵	transparente, laranja, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6026	10 ⁶	transparente, rosa, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	6028	2,5x10 ⁵	amarela, fosca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
	6029	38x10 ⁵	transparente, borda lisa, pouco brilhante, pequena	bastonete, com esporos, G+
	60210	0,5x10 ⁵	creme, fosca, borda irregular	bastonete G-
	60211	10 ⁶	amarela mais forte, transparente, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	60212	8,5x10 ⁵	amarela esbranquiçada, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
	60214	6x10 ⁵	creme, brilhante, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
6031	10 ⁶	transparente, centro branco, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+	
6032	3,5x10 ⁵	transparente, borda irregular,	bastonete, com	

		brilhante	esporos, G+	
6034	4x10 ⁵	transparente, amarelada, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+	
6035	0,5x10 ⁵	transparente, laranja, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+	
6036	7x10 ⁵	transparente, rosa, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+	
6038	38,5x10 ⁵	amarela, fosca, borda lisa	bastonete, G+, com esporos	
6039	120x10 ⁵	transparente, borda lisa, pouco brilhante, pequena	bastonete, com esporos, G+	
60310	0,5x10 ⁵	creme, fosca, borda irregular	bastonete, com esporos, G+	
60311	14x10 ⁵	amarela mais forte, transparente, borda lisa, brilhante	Bastonete, com esporos, G+	
60312	58x10 ⁵	amarela esbranquiçada, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+	
60313	2x10 ⁵	creme, centro elevada, borda irregular	bastonete, com esporos, G+	
60314	9x10 ⁵	creme, brilhante, borda irregular	bastonete, com esporos, G+	
Total	Número de morfotipos	32		
Biopilha 90	9011	3x10 ⁶	amarela, borda lisa, pouco brilhante	bastonete, com esporo, G+
	9012	6x10 ⁶	transparente, amarelada, fundo furta cor, borda irregular	bastonete, com esporo, G+
	9013	1x10 ⁶	bege, fosca, borda irregular, superfície enrugada	bastonete, com esporos, G+
	9014	28,5x10 ⁶	creme, borda lisa, brilhante, aspecto aquoso	cocobacilo G-
	9015	1x10 ⁶	transparente, amarelada, brilhante, borda irregular	bastonete, com esporo, G+
	9016	4,5x10 ⁶	transparente, rosada, superfície pouco brilhante, borda lisa	bastonete, com esporo, G+
	9017	1x10 ⁶	creme, borda irregular, opaca	bastonete, com esporos, G+
	9018	0,5x10 ⁶	creme, rosada, borda irregular, superfície enrugada	bastonete, com esporos, G+
	9019	0,5x10 ⁶	creme, superfície enrugada, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
	90110	2,5x10 ⁶	rosada, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
	90111	3,5x10 ⁶	branca, superfície enrugada,	bastonete, com

		borda irregular	esporos, G+
90112	1,5x10 ⁶	laranja, borda lisa, pouco brilhante	bastonete, com esporos, G+
90113	0,5x10 ⁶	bege, opaca, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
90114	0,5x10 ⁶	transparente, bege, borda irregular, centro mais bege	bastonete, com esporos, G+
9021	17x10 ⁶	creme, brilhante, borda lisa	bastonete, G-
9022	0,5x10 ⁶	creme, opaca, borda irregular, superfície rugosa	bastonete G-
9023	0,5x10 ⁶	centro creme, borda transparente, irregular, brilhante	bastonete, com esporos, G+
9024	0,5x10 ⁶	creme, clara, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
9025	3x10 ⁶	creme, rosada, superfície elevada, borda irregular, opaca	bastonete, com esporos, G+
9026	14,5x10 ⁶	amarelada, borda lisa, pouco brilhante, elevada no centro	bastonete, com esporos, G+
9027	0,5x10 ⁶	rosada, borda fina, transparente, irregular, centro mais rosada, c/ círculo do qual partem raios	bastonete, com esporos, G+
9028	0,5x10 ⁶	creme, borda irregular, superfície enrugada	bastonete, com esporos, G+
9029	2x10 ⁶	transparente, centro amarelado, borda irregular	bastonete, com esporos, G+
90210	2,5x10 ⁶	transparente, rosada no centro, borda lisa,	bastonete, com esporos, G+
90211	0,5x10 ⁶	transparente, borda irregular, aspecto de flor	bastonete, com esporos, G+
90212	1,5x10 ⁶	amarela, pouco brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
90213	0,5x10 ⁶	creme, borda irregular, opaca, grande	bastonete, com esporos, G+
90214	0,5x10 ⁶	rosa, opaca, borda irregular, centro mais rosa	bastonete, com esporos, G+
90215	0,5x10 ⁶	rosa, brilhante, borda lisa, fundo furta-cor	bastonete, com esporos, G+
90216	0,5x10 ⁶	branca, superfície enrugada	bastonete, com esporos, G+
9031	2,5x10 ⁶	amarela, borda lisa, levemente brilhante	bastonete, com esporos, G+

9032	1x10 ⁶	amarela leitosa, brilhante, borda lisa	bastonete, com esporos, G+
9033	0,5x10 ⁶	rosa, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
9034	23x10 ⁶	creme, rosada, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
9035	11,5x10 ⁶	centro creme, borda transparente, lisa, pouco brilhante	bastonete, com esporos, G+
9036	1,5x10 ⁶	creme, borda irregular, opaca, colônia grande	Bastonete, com esporos, G+
9037	1x10 ⁶	amarela, transparente, borda lisa, brilhante	bastonete, com esporos, G+
9038	2x10 ⁶	creme, opaca, borda irregular	bastonete em cadeia, com esporos, G+
9039	1,5x10 ⁶	creme, clara, borda lisa, raios partindo do centro	bastonete, com esporos, G+
Total	Número de morfotipos	39	

10.2 Avaliação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de compostos hidrofóbicos (Óleo diesel, hexadecano e óleo de corte Daido-Dairoll PA5A) pela técnica do NMP (Número mais provável)

10.2.1 Determinação da população heterotrófica total

Para cada amostra, determinou-se a densidade de bactérias heterotróficas totais, calculando-se o número mais provável (NMP/g) em meio Luria-Bertani (LB), de acordo com Briones e colaboradores (1999), utilizando o software Excel. Após uma semana de incubação, obteve-se os valores de absorvância a 490nm. Estes valores foram utilizados para determinação do NMP/g. Todos os poços que apresentaram valores de densidade ótica a 490 nm maiores que os valores nos poços controle (meio LB sem adição das amostras diluídas) foram considerados positivos.

A densidade de bactérias heterotróficas totais não variou com a idade das biopilhas, mantendo-se com a densidade de $6,55 \times 10^7$ NMP/g solo. Comparando-se estes dados com os obtidos pelo método de plaqueamento direto observa-se que os valores obtidos com a técnica de NMP foram 3,3 e 1,5 vezes maiores nas biopilhas de 30 e 60 dias, respectivamente, e 0,26 vez menor na biopilha de 90 dias. Esta diferença não é significativa, considerando a complexidade de ambas técnicas e não atinge uma ordem de grandeza. Em um estudo com biopilhas, Seabra (2005) analisou a contaminação artificial de amostras de solos com hidrocarbonetos do petróleo e determinou a população microbiana heterotrófica total nas biopilhas ao longo do tempo. Inicialmente, as contagens microbianas ficaram em torno de 10^6 NMP/g solo. Com o aumento da idade das biopilhas (8 semanas de decomposição) os valores de NMP ficaram em torno de 10^7 e 10^8 NMP/g solo, e se estabilizaram ao final do experimento (16 semanas de decomposição) em torno de 10^7 NMP/g solo.

10.2.2 Quantificação da população de bactérias degradadoras de compostos hidrofóbicos (Hexadecano, Óleo diesel e Óleo Daido-Dairoll PA-5A) pela técnica de NMP

Os dados das populações de bactérias degradadoras dos compostos óleo diesel, hexadecano e óleo Daido-Dairoll-PA5A estão apresentados na figura 5.

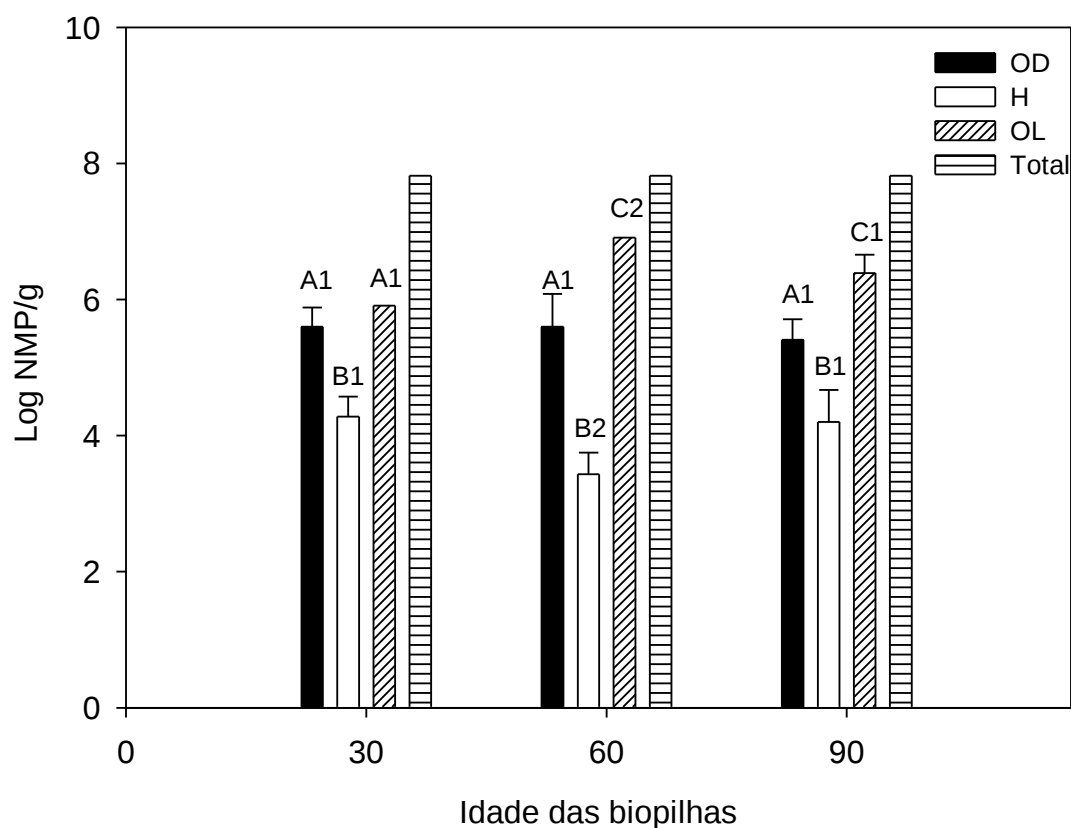


Figura 5: Densidade da população bacteriana degradadora de compostos hidrofóbicos: Óleo diesel (OD), Hexadecano (H) e Óleo Daido-Dairoll PA-5A (OL) para as biopilhas de 30, 60 e 90 dias de decomposição determinada pela técnica de NMP. Barras indicam os valores de desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras no mesmo grupo de colunas ou de mesmos números nas barras de mesmo padrão não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

As densidades das populações bacterianas degradadoras variaram significativamente entre as amostras de biopilhas de diferentes idades, e com as fontes de carbono ($p < 0,05$). De forma geral, para as amostras das biopilhas de 30, 60 e 90 dias, a fonte de carbono que mais favoreceu o aumento da população foi o óleo de corte Daido-Dairoll PA-5A, seguido de óleo diesel e hexadecano. A população degradadora de óleo diesel se manteve estável ao longo do período de estudo. A população degradadora de hexadecano e de óleo Daido-Dairoll PA-5A diminuiu de 30 para 60 dias, e aumentou de 60 para 90 dias.

Os dados de densidade das populações degradadoras de óleo diesel, hexadecano e Óleo Daido-Dairoll PA-5A foram comparados com os dados da densidade total obtida a partir do crescimento em meio LB. A população degradadora de óleo Daido-Dairoll-PA5A apresentou as maiores porcentagens em relação à população total em todas as biopilhas (1,25, 12,52 e 4,18% para as biopilhas de 30, 60 e 90 dias, respectivamente), seguida da população degradadora de óleo diesel (0,73, 0,83 e 0,47% para as biopilhas de 30, 60 e 90 dias, respectivamente) e hexadecano (0,034, 0,005 e 0,033% para as biopilhas de 30, 60 e 90 dias, respectivamente). Esta variação na densidade da população degradadora de substratos particulares sugere que a microbiota associada à biopilha se modifica, à medida que ocorre o consumo destes compostos (Bento et al., 2005), e a comunidade vai se ajustando para metabolizar diferentes compostos ao longo do tempo de decomposição. Mais especificamente, a diferença na composição e no número de micro-organismos presentes capazes de tolerar e crescer nas fontes de carbono específicas.

10.3. Avaliação da diversidade metabólica de populações bacterianas cultiváveis utilizando o sistema ECOPLATE-Biolog

Para estudar a diversidade metabólica das populações, foram utilizados os parâmetros riqueza (S), índice de diversidade de Shannon (H), e a equitabilidade (E). S é definida como o número de fontes de carbono utilizadas pela comunidade microbiana e H reflete a riqueza de substratos e a intensidade com que esses substratos são utilizados pela microbiota (Zak et al., 1994).

Esses parâmetros variaram com a idade da biopilha ($p < 0,05$) (Tabela 3). O aumento da idade da biopilha de 30 para 60 dias causou um aumento transiente da diversidade metabólica microbiana, a qual volta a ser estatisticamente igual na biopilha de 90 dias. O mesmo padrão é observado para os dados de equitabilidade de substratos, que avalia a uniformidade de utilização de um substrato em relação ao número de substratos utilizados pela microbiota nas diferentes biopilhas.

Tabela 3: Índice de diversidade de Shannon para diversidade funcional, riqueza e equitabilidade da comunidade microbiana das biopilhas com diferentes idades.

Idade da biopilha (dias)	Índice de Shannon (H)	Riqueza (S)	Equitabilidade (E)
30	3,216 a	29 a	0,955 a
60	3,375 b	30 b	0,992 b
90	3,376 b	30 b	0,995 b

- As médias seguidas pelas mesmas letras, numa mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com nível mínimo de significância de 0,05.

Comunidades microbianas diferem de outras comunidades biológicas devido ao imenso número de espécies envolvidas e, também, por seu curto período de geração. Assim, alterações nas condições ambientais responsáveis pela substituição de nichos microbianos podem favorecer a habilidade de espécies previamente dormentes em se tornar competitivas e dominar a comunidade (Yan et al., 2000).

O estudo do perfil fisiológico de comunidades pode refletir o potencial da microbiota analisada em degradar diferentes fontes de carbono (Teng et al., 2010). O que se pode observar em nosso estudo, é que a diversidade metabólica das amostras aumentou com a idade das biopilhas, o que pode indicar que as biopilhas com maiores idades têm o potencial para degradar um maior número de compostos. Esse resultado mostra-se interessante, a partir do momento em que um dos objetivos deste estudo foi caracterizar melhor os micro-organismos presentes nas biopilhas, que podem ser produtores de compostos ativos de superfície. Os ambientes contaminados com hidrocarbonetos são interessantes para esse tipo de estudo, pois são conhecidos por possuírem uma razão de C: P/N maior que em ecossistemas naturais (Becker, 1999). Isso acarreta em um maior número de micro-organismos em condições de metabolizar prontamente diversos compostos de interesse, já que o fluxo de nutrientes é alto.

O perfil metabólico deve ser considerado um indicador relativo de alterações nas comunidades microbianas em diferentes condições ambientais (Gomez et

al., 2004), e seus resultados devem ser interpretados com parcimônia, considerando-se que as diferentes fontes de carbono nas microplacas Biolog EcoPlate® não abrangem toda a gama de compostos nutricionais presentes nos ambientes naturais (Konopka et al., 1998). Ainda, segundo Ros e colaboradores (2008), a utilização de um método dependente de cultivo para avaliar a diversidade microbiana tem limitações, pois não inclui os microorganismos não cultiváveis, que provavelmente predominam nos solos.

Estudos envolvendo o uso de técnicas moleculares para determinar a seletividade dos poços Biolog sem se basear em microrganismos cultiváveis (DiGiovanni et al., 1997) revelam que a diversidade de microrganismos que crescem em diferentes fontes de C é menor que a encontrada na amostra original, com diferentes seleções preferenciais em função da fonte de carbono.

10.3.1 Metabolismo Heterotrófico Médio

O Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) foi determinado para saber como as fontes de carbono estão sendo consumidas ao longo do tempo. Ele foi determinado através da capacidade média de utilização das 31 fontes de carbono em placas Biolog (Figura 6). Observa-se que os valores de MHM aumentaram com a idade da biopilha. Na análise de variância, as menores médias foram atribuídas à biopilha de 30 dias. Já para as biopilhas de 60 e 90 dias o MHM foi maior, e considerado estatisticamente igual entre elas ($p < 0,05$). A análise do tempo de incubação das amostras nas placas de Biolog-ECOPLATE, revelou uma diferença significativa entre 24, 48 e 72 h, indicando que para uma mesma amostra o MHM se modifica ao longo do tempo, com uma tendência para a estabilização. Como houve uma prévia padronização do inóculo, os maiores valores de MHM encontrados nas amostras não podem ser atribuídos a uma maior biomassa microbiana, mas refletem, provavelmente, alterações na fisiologia da comunidade (Haack et al., 1995). A variação do MHM reflete, provavelmente, uma alteração da comunidade microbiana resultante da aclimatação nas biopilhas adicionadas de compostos oleosos. Esta reestruturação da comunidade microbiana resultou em modificações do estado metabólico, e, conseqüentemente do MHM.

Para avaliar se as microbiotas das biopilhas variaram quanto à cinética de utilização das 31 fontes de carbono, determinou-se a velocidade de utilização dos substratos em função do tempo, indicada pelo coeficiente angular das retas obtidas pelas plotagens dos valores de MHM em função do tempo. Os maiores valores foram observados para a biopilha de 60 dias (0,0298 e $R^2=0,98$), seguida da de 90 dias (0,0287 e $R^2=0,92$) e 30 dias (0,0135 e $R^2=0,99$).

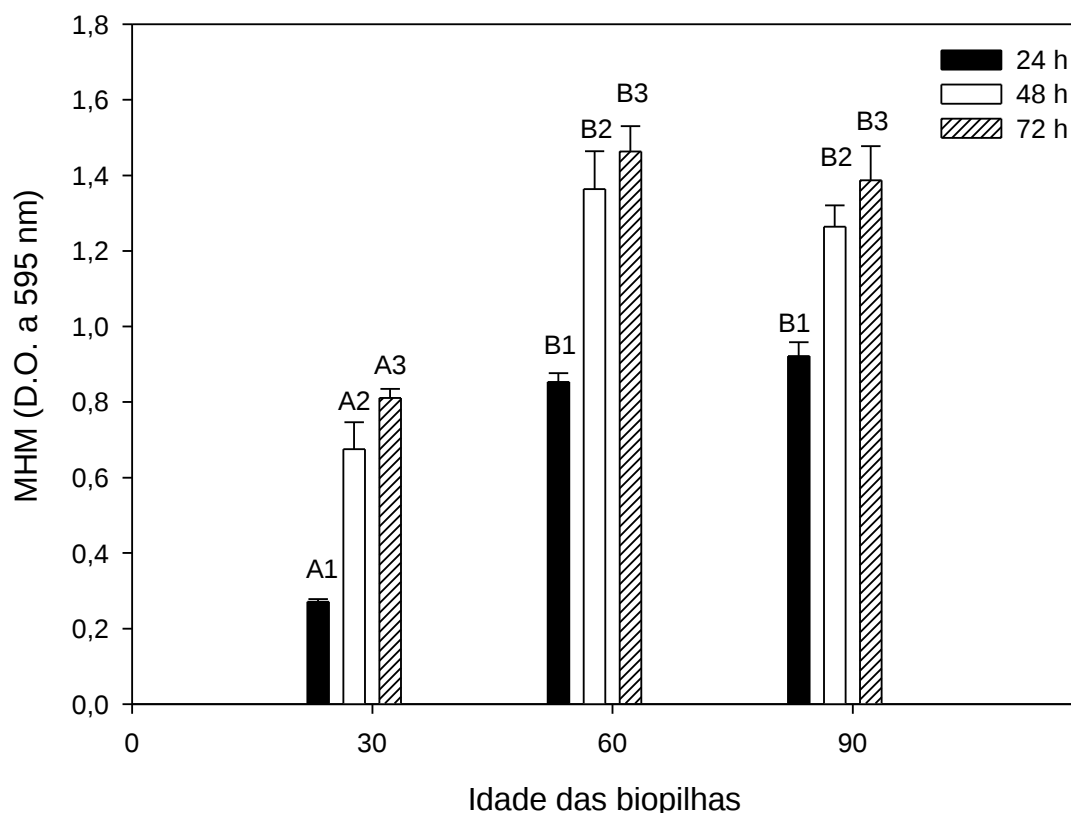


Figura6: Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) das biopilhas de 30, 60 e 90 dias, incubadas por 24, 48 e 72 h em placas Biolog-ECOPLATE. Barras indicam os valores de desvio padrão. Médias seguidas de mesmas letras entre os grupos de colunas e de mesmos números no mesmo grupo de colunas foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Scott-Knott com nível mínimo de significância de 0,05.

A similaridade dos perfis de utilização de fontes de C pela microbiota nas biopilhas de diferentes idades pode ser avaliada também através da análise de agrupamento do vizinho mais próximo. Os dados mostram que de uma maneira geral o perfil de utilização de fontes de C pela microbiota das biopilhas de 60 dias foi mais semelhante ao da biopilha de 90 dias (distância euclidiana de 1,22) do que a de 30 dias (distância euclidiana de 5,28) (Figuras 7). No

dendrograma vertical, a leitura é feita da direita para esquerda, no qual o eixo y indica as distâncias entre os grupos que foram formados, e a posição da reta na escala, ou o eixo x, representa os grupos unidos por ordem decrescente de semelhança.

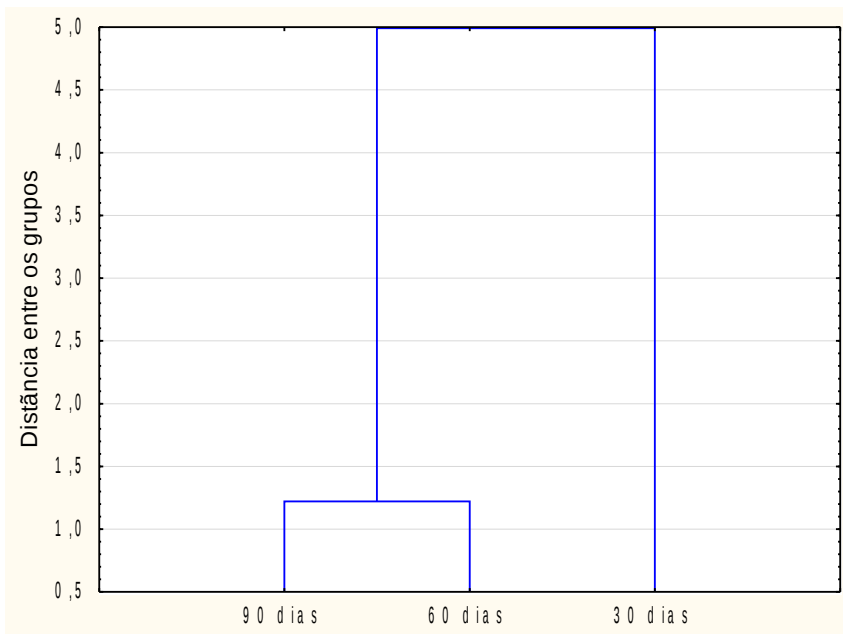


Figure 7. Análise de agrupamento dos dados de Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) das biopilhas pelo método de ligação simples considerando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade para as biopilhas de diferentes idades.

Houve diferenças quanto aos grupos de substratos utilizados pela comunidade microbiana das biopilhas, indicando diferenciação funcional destas comunidades microbianas (Figura 8). Neste dendrograma, quanto menor a distância entre dois substratos, mais semelhantemente eles foram consumidos pela microbiota bacteriana. Não foi possível agrupar os compostos pelas classes químicas, de acordo com Dobranic e Zak (1999).

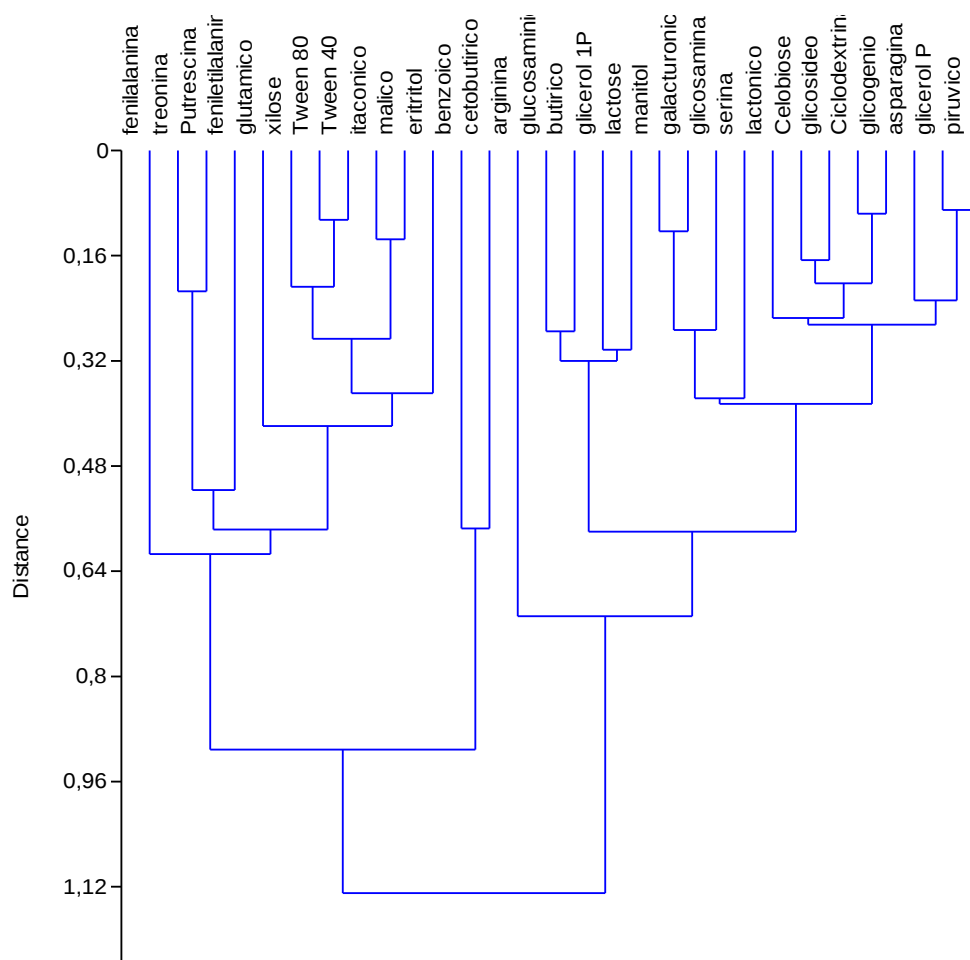


Figura 8: Análise de agrupamento dos dados de Metabolismo Heterotrófico Médio (MHM) das biopilhas de 30, 60 e 90 dias pelo método de ligação simples considerando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade para as diferentes fontes de carbono.

11 Isolamento de bactérias degradadoras de compostos hidrofóbicos pelos métodos de enriquecimento e seleção de superfícies hidrofóbicas

Para a obtenção dos isolados, as amostras das biopilhas de diferentes idades foram submetidas à dois métodos de seleção, o enriquecimento em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono, e a seleção de de micro-organismos com superfícies hidrofóbicas por meio do método de flotação.

11.1 Isolamento de bactérias degradadoras de compostos hidrofóbicos (hexadecano, óleo diesel e óleo lubrificante) pelo método de enriquecimento

De uma forma geral, o número de isolados variou com a fonte de carbono utilizada no enriquecimento. A utilização de Óleo diesel (1% v/v) como fonte principal de carbono e energia possibilitou o isolamento de 8, 4 e 6 morfotipos para as biopilhas de 30, 60 e 90 dias, respectivamente (Tabela 4). Já com a utilização de hexadecano (1% v/v) foram obtidos 1, 3 e 7 isolados para as biopilhas de 30,60 e 90 dias, respectivamente. Por fim, o isolamento realizado com óleo lubrificante possibilitou a seleção de 4, 5 e 4 morfotipos para as biopilhas de 30,60 e 90 dias, respectivamente. Ao todo foram obtidos 42 isolados, sendo que óleo diesel e óleo lubrificante foram as fonte de carbono que possibilitaram a seleção de um maior número de isolados.

Os isolados obtidos foram descritos e realizou-se a coloração pelo método de Gram para a descrição da morfologia das células, presença de arranjos, esporos e o tipo de reação tintorial à coloração de Gram (Tabela 4). Houve a repetição de morfotipos nas diferentes biopilhas. Dos 13 isolados da biopilha de 30 dias, 5 são bactérias Gram positivas e 8 Gram negativas. Já na biopilha de 60 dias foram isolados 4 morfotipos Gram positivos e 8 Gram negativos. Por fim, foram selecionados 16 morfotipos Gram positivos e 1 Gram negativo na biopilha de 90 dias. Na biopilha de 30 dias os morfotipos mais predominantes foram bastonetes sem arranjo (7), seguido de bastonetes com esporos (4), com arranjo (1) e coco (1). Na de 60 dias, houve predomínio de bastonetes sem arranjos (9), seguidos de bastonetes sem esporos (3). Não foram observadas células com arranjos nem do tipo cocos. Por fim, na biopilha de 90 dias foram encontrados somente bastonetes sem arranjo (10) e bastonetes com esporos (7).

A técnica de enriquecimento é comumente empregada para a seleção de micro-organismos degradadores, utilizando-se meios de cultura adicionados de fonte de carbono específicas. A escolha em utilizar as fontes de carbono hidrofóbicas em nosso trabalho é pautada na grande quantidade de trabalhos publicados utilizando fontes dessa natureza (Lin et al., 2009). É bem conhecido na literatura que micro-organismos cultivados em hidrocarbonetos são capazes de produzir biopolímeros com atividades emulsificantes e surfactantes. Isto pode ser considerado uma estratégia biológica para aumentar a disponibilidade de

substratos hidrofóbicos (Toledo et al., 2006), por isso o enriquecimento se mostra uma estratégia interessante para a seleção de produtores de CAS. Entretanto, encontra-se também trabalhos que utilizam fontes hidrofílicas que sejam capazes de induzir a formação de CAS.

Ruggeri e colaboradores (2009) isolaram bactérias produtoras de compostos ativos de superfície de ambientes contaminados com hidrocarbonetos. No enriquecimento foram utilizados substratos hidrofílicos e hidrofóbicos (melado de beterraba, glicose, n-hexadecano e óleo de canola) para a seleção destes micro-organismos. Foram obtidas um total de 27 linhagens bacterianas, das quais 19 foram produtoras desses compostos. Todas as fontes de carbono utilizadas foram adequadas para a produção de CAS por esses isolados. Em um estudo com isolados de solo e água contaminados com óleo cru e seus subprodutos, Batista e colaboradores (2006) isolaram 185 linhagens, provenientes do enriquecimento em meio mineral contendo óleo cru ou gasolina como fonte de carbono. 19 isolados foram detectados como produtores de compostos ativos de superfície utilizando o teste colapso da gota.

Tabela 4: Descrição morfológica das colônias, morfologia celular e reação tintorial de Gram dos isolados obtidos nas biopilhas de 30, 60 e 90 dias obtidas pelo método de enriquecimento.

<i>Local de isolamento</i>	<i>Morfotipo</i>	<i>Meio de isolamento</i>	<i>Descrição das colônias</i>	<i>Morfologia da célula, reação tintorial de Gram</i>
Biopilha 30	EOD3011	MMBOD	creme, ponto escuro no centro, borda lisa, opaca	bastonete com esporo, G+
	EOD3012	MMBOD	amarela, borda lisa, opaca	Bastonete, G-
	EOD3013	MMBOD	creme, borda lisa, brilhante	Bastonete, G-
	EOD3014	MMBOD	castanha clara, borda irregular, opaca	Bastonete, G-
	EOD3021	MMBOD	creme, borda lisa, brilhante	Bastonete, G-
	EOD3022	MMBOD	creme, borda lisa, brilhante	bastonete com esporo, G+
	EOD3031	MMBOD	creme, borda lisa, brilhante, com elevação	Coco, G-
	EOD3032	MMBOD	amarela, borda lisa, opaca	Bastonete, G-

	EH3021	MMBH	branca, opaca, borda lisa, ("véu" ao redor das colônias)	Bastonete em cadeia, G+
	EOL3011	MMBOL	creme, amarelada, centro mais escuro	bastonete com esporo, G+
	EOL3021	MMBOL	creme, escura, borda lisa, brilhante	Bastonete, G-
	EOL3022	MMBOL	branca, borda lisa, brilhante	bastonete com esporo, G+
	EOL3031	MMBOL	creme, amarelada, centro mais escuro	Bastonete, G-
Total	13			
	EOD6011	MMBOD	creme, borda irregular, centro mais escuro	bastonete com esporos, G+
	EOD6012	MMBOD	branca, borda irregular, brilhante	Bastonete, G-
	EOD6013	MMBOD	creme, borda lisa, opaca	bastonete com esporos, G+
	EOD6021	MMBOD	branca, borda irregular, centro mais escuro	Bastonete, G-
	EH6011	MMBH	creme, centro elevado, borda irregular, opaca, centro escuro	Bastonete, G+
Biopilha 60	EH6012	MMBH	amarela, borda irregular, opaca, pequena	Bastonete, G-
	EH6032	MMBH	branca, filamentosa, borda irregular	Bastonete, G-
	EOL6011	MMBOL	amarela, borda lisa, brilhante, pequena	bastonete com esporos, G+
	EOL6012	MMBOL	branca, brilhante, borda lisa	Bastonete, G-
	EOL6031	MMBOL	opaca, grande, filamentosa	Bastonete, G-
	EOL6032	MMBOL	creme amarelada, centro mais escuro, borda mais clara	Bastonete, G-
	EOL6033	MMBOL	creme, brilhante, borda lisa	Bastonete, G-
Total	12			
Biopilha 90	EOD9011	MMBOD	creme, amarelada, borda irregular, opaca	Bastonete, G+
	EOD9012	MMBOD	creme, borda lisa, brilhante, aspecto aquoso	Bastonete, G-
	EOD9021	MMBOD	amarela, borda irregular, opaca	Bastonete com esporo, G+
	EOD9022	MMBOD	branca, borda lisa, brilhante	Bastonete, G+
	EOD9031	MMBOD	branca, borda lisa, brilhante	Bastonete com esporo, G+

EOD9032	MMBOD	creme, borda irregular, centro mais corado, aspecto de vulcão	Bastonete com esporo, G+
EH9011	MMBH	creme-rosada, borda irregular, opaca	Bastonete, G+
EH9013	MMBH	transparente, brilhante, borda lisa	Bastonete, G+
EH9021	MMBH	amarela clara, borda lisa, brilhante	Bastonete com esporo, G+
EH9022	MMBH	branca, borda lisa, brilhante, muito pequena	Bastonete, G+
EH9031	MMBH	branca, borda lisa, brilhante	Bastonete, G+
EH9032	MMBH	branca, borda lisa, opaca	Bastonete com esporo, G+
EH9033	MMBH	amarela, borda irregular, opaca	Bastonete, G+
EOL9011	MMBOL	branca, opaca, muito pequena, borda irregular	Bastonete, G+
EOL9012	MMBOL	amarela, borda irregular, pouco brilhante	Bastonete com esporo, G+
EOL9013	MMBOL	amarela, borda irregular, pouco brilhante	Bastonete com esporo, G+
EOL9014	MMBOL	branca, borda lisa, brilhante	Bastonete, G+
Total	17		

Legenda: MMBOD (Meio Mineral para bactérias + 1% óleo diesel); MMBH (MMB+ 1% Hexadecano); MMBOL (MMB+ 1% óleo Daido-Dairoll-PA5A)

11.2 Seleção de bactérias com superfície hidrofóbica (flotação)

A utilização da metodologia baseada na flotação de bactérias com superfícies hidrofóbicas permitiu a obtenção de 53 isolados, dos quais 19 foram provenientes da biopilha de 30 dias, 20 da de 60 dias e 14 da biopilha de 90 dias. A descrição das colônias, morfologia das células, arranjo e a reação tintorial de Gram se encontram descritos na Tabela 5. Ao todo foram obtidos 31 isolados Gram positivos (somente bastonetes) e 22 isolados Gram negativos (bastonetes e cocos).

Como no enriquecimento, a morfologia celular mais predominante foi o bastonete sem esporos para as biopilhas de 30 e 60 dias (14 e 12 isolados respectivamente), seguido de bastonetes com esporo (4 e 7 isolados respectivamente). Observou-se a presença de 1 coco Gram-positivo na biopilha

de 60 dias. Os isolados provenientes da biopilha de 90 dias se constituíram em sua maioria de bastonetes com esporos (9), bastonetes (2), bastonetes com arranjo sem esporos (1) e bastonetes com arranjo e esporos (2), esse último morfotipo foi encontrado somente nesta biopilha.

A técnica de flotação para a seleção de micro-organismos com superfície hidrofóbica foi relatada primeiramente por Smith e Furcolow, 1964 e posteriormente adaptada por Iwatsu e colaboradores (1981). Satow e colaboradores (2008) utilizaram essa técnica para a seleção de leveduras negras de ambientes contaminados com hidrocarbonetos. Segundo os autores, a adição de óleo mineral ao meio parece ser fundamental para o sucesso da técnica, uma vez que permite a formação de fases distintas na suspensão concentrando células de superfície hidrofóbica na interface água-óleo.

Este método foi escolhido, uma vez que a importância da hidrofobicidade celular na quebra de emulsões tem sido citada na literatura constantemente. De acordo com Liu e colaboradores (2011) ela é dependente de fatores como o meio de crescimento, pH, as propriedades físico-químicas e a composição das moléculas constituintes da superfície celular, e pode explicar em parte o processo de quebra de emulsões. A alta hidrofobicidade celular permite o acesso direto à compostos hidrofóbicos, adesão nas gotas de óleo na interface, levando à desestabilização destes sistemas. Em algumas espécies, como *Rhodococcus* sp., a hidrofobicidade constitui um dos principais mecanismos que permite o contato direto com gotas grandes de óleo (Bredholt, et al., 1998).

Tabela 5: Descrição morfológica das colônias, reação tintorial de Gram e morfologia celular dos isolados das biopilhas de tratamento de resíduos oleosos obtidas pelo método de flotação.

<i>Local de isolamento</i>	<i>Morfotipo</i>	<i>Descrição das colônias</i>	<i>Morfologia da célula</i>	<i>Gram</i>
Biopilha 30	F3011	rosa, brilhante, borda lisa	bastonete	G-
	F3012	creme, brilhante, borda lisa, centro mais creme	bastonete com esporo	G+
	F3013	creme, opaca, borda irregular	bastonete	G-
	F3014	rosa, opaca, borda irregular	bastonete	G-

	F3015	transparente, borda lisa, opaca	bastonete com esporo	G+
	F3016	rosa, opaca, borda lisa	bastonete	G-
	F3017	branca, opaca, elevada, borda irregular,	bastonete	G-
	F3018	branca, opaca, elevada, borda irregular,	bastonete	G-
	F3019	creme, opaca, borda irregular	bastonete em cadeias	G-
	F3021	branca, borda elevada, irregular, opaca,	bastonete	G+
	F3022	rosa no centro, borda clara e lisa, brilhante	bastonete	G+
	F3023	branca, cotonosa, borda irregular	bastonete	G+
	F3024	transparente, borda irregular, reverso furta-cor	bastonete	G+
	F3025	creme, borda irregular, opaca	bastonete, com esporo	G+
	F3026	transparente, opaca, borda filamentosa	bastonete, com esporo	G+
	F3027	transparente, opaca, borda irregular	Bastonete	G-
	F3031	branca, borda irregular, opaca, (L)	Bastonete	G-
	F3032	creme, opaca, centro emaranhado, borda lisa, (L)	Bastonete	G-
	F3033	amarela, muito pequena	Bastonete	G-
	Total	19		
Biopilha 60	F6011	creme, transparente, borda irregular, reverso furta cor	Bastonete	G+
	F6012	creme, borda lisa, brilhante	Bastonete	G+
	F6013	creme, borda irregular, fosca,	bastonete com esporos	G+
	F6014	laranja, borda lisa, brilhante	bastonete com esporos	G+
	F6015	creme, borda irregular, mais clara, centro mais fosco,	bastonete com esporos	G+
	F6016	transparente, borda irregular	bastonete com esporos	G+
	F6017	branca, borda irregular, muito pequena	cocos	G+
	F6018	transparente, borda mais clara, centro mais colorido, tendendo para rosa,	bastonete com esporo	G+

raiada				
	F6021	creme, fosca, borda irregular, centro mais creme	bastonete	G-
	F6022	creme, brilhante, borda lisa	Bastonete	G+
	F6023	transparente, borda irregular, brilhante	bastonete	G+
	F6024	creme amarelada, borda lisa, brilhante	bastonete	G+
	F6025	creme, fosca, colônia elevada	bastonete	G-
	F6026	creme, fosca, borda irregular	bastonete	G-
	F6031	laranja, borda lisa, brilhante	bastonete	G-
	F6032	creme, borda irregular, fosca, (L)	Bastonete	G-
	F6033	transparente, borda irregular, centro creme	bastonete com esporos	G+
	F6034	transparente borda, centro fosco, borda irregular,	bastonete com esporo	G+
	F6035	rosa, borda lisa, brilhante, pegajosa	bastonete	G-
	F6036	amarela, borda lisa, brilhante	bastonete	G-
	Total	20		
Biopilha 90	F9011	creme, brilhante, borda lisa	bastonete com esporos	G+
	F9012	creme, fosca, borda irregular	bastonete em cadeias, com esporos	G+
	F9013	creme, borda lisa, brilhante, aspecto aquoso	bastonete com esporo	G+
	F9014	marrom, fosca, borda irregular	Bastonete com esporos	G+
	F9015	amarela, centro mais creme, brilhante, borda lisa	Bastonete	G-
	F9016	rosada, fosca, borda irregular	bastonete com esporo	G+
	F9017	rosa, fosca, borda lisa	bastonete, com esporos	G+
	F9021	creme, opaca, borda irregular, furta-cor	Bastonete	G-
	F9022	creme, elevada, borda irregular, fosca	bastonete com esporos	G+
	F9023	branca, fosca, borda irregular	Bastonete em cadeias, com esporos	G+

F9024	rosa, fosca, elevada	Bastonete com esporos	G+
F9031	rosa, brilhante, borda lisa, fundo furta- cor	bastonete com esporo	G+
F9032	amarela, brilhante, borda lisa, grande	bastonete em cadeias	G-
F9033	transparente- creme, fosca, elevada, borda irregular	bastonete com esporos	G+
Total	14		

12 Crescimento, atividade emulsificante e surfactante de linhagens produtoras de compostos ativos de superfície

Os isolados obtidos com o método de enriquecimento e seleção de superfícies hidrofóbicas foram avaliados quanto à capacidade de produzir moléculas ativas de superfície após o cultivo em meio mineral adicionado de diferentes fontes de carbono, óleo diesel, hexadecano e glicose. Em nosso estudo as linhagens isoladas foram testadas em relação à capacidade hemolítica, porém foram realizados outros testes para confirmação da produção de CAS, como medida do E_{24} e a atividade surfactante. Os resultados relativos à estes testes estão apresentados nas tabelas 6 e 7, cada uma com os resultados para os isolados obtidos com os diferentes métodos de isolamento, enriquecimento e flotação, respectivamente.

12.1 Crescimento em diferentes fontes de carbono

Para verificar a produção de substâncias emulsificantes ou surfactantes os isolados foram cultivados em meio mineral acrescido de fontes de carbono hidrofóbicas e hidrofílicas. O crescimento variou de acordo com as fontes utilizadas e os isolados. De uma maneira geral, a análise de variância revelou que as maiores médias de crescimento foram proporcionadas pelo cultivo em meio mineral contendo óleo diesel. O crescimento em hexadecano e glicose foi considerado estatisticamente igual. Dentre os isolados analisados, EOL6031, EOD9022, EOD3013 foram os isolados que apresentaram os menores valores de densidade ótica. No outro extremo, os isolados EH9032, EH6031, F6021 e EOL9014 apresentaram as maiores densidades óticas. No desdobramento dos dados, a influência das fontes de carbono foi analisada para cada linhagem. Em alguns casos, as diferentes fontes de carbono promoveram um crescimento estatisticamente igual (EH3021, EH6011, EH6034, EH6035, dentre outros), diferente (EH9032, F6015), ou igual para no mínimo duas fontes de carbono (EH6012, EH6021, EOD9021, EOD3012), como na maioria dos casos.

Analisando os dados de variância, os isolados provenientes dos diferentes métodos de seleção foram agrupados em 5 classes ($a_5 > a_4 > a_3 > a_2 > a_1$) de acordo com os valores de densidade ótica. No grupo com os menores valores (a_1 , a_2)

predominaram isolados provenientes do enriquecimento, assim como no grupo com os maiores (a5). Somente em um grupo (a3) houve predominância de isolados da flotação. No grupo a4 não houve predomínio. Na tabela 8 abaixo, seguem os valores de referência para as classes citadas acima.

Tabela 8: Valores de densidade ótica a 600 nm agrupados em 5 classes pela análise de variância

Classe	a1	a2	a3	a4	a5
Faixa de D.O 600 nm	0,07-0,28	0,31-0,52	0,54-0,80	0,83-0,99	1,05-1,21

Legenda: D.O – densidade ótica

12.2 Hemólise em ágar sangue e formação de halos em meio sólido contendo CTAB-azul de metileno

Para a biopilha de 30 dias, 43% dos isolados apresentaram atividade hemolítica. Os isolados EOD3012, EOD3013 e EOL3011 (14% dos isolados) apresentaram hemólise quando cultivados nas três fontes de carbono, o que não ocorreu para os demais isolados. Houve um número maior de resultados positivos (hemólise total) para os isolados cultivados em hexadecano e glicose. Já para os isolados obtidos com o processamento da biopilha de 60 dias, o número de resultados positivos (71%) foi maior que os da biopilha de 30 dias, assim como os isolados que apresentaram atividade hemolítica cultivados nas três fontes de carbono, em torno de 26% dos isolados, quais sejam: EH6034, EH6035, EH6036, F6013, F6017, F6018, F6021, F6024 e F6026. Novamente, hexadecano e glicose propiciaram um maior número de resultados positivos (57% e 51% respectivamente). Por fim, a biopilha de 90 dias apresentou o menor percentual de isolados positivos para hemólise (22%) sendo que apenas 11% promoveram a lise hemácias quando cultivados nas três fontes de carbono (F9031 e F9032). Nesse caso a glicose promoveu o maior percentual de resultados positivos (21%) seguidos de óleo diesel e hexadecano (10,5% para ambos).

A hemólise em ágar sangue de carneiro é utilizada por alguns autores como um teste primário para a seleção de linhagens produtoras de CAS (Gandhimathi et al., 2009; Thavasi et al., 2008). Este ensaio deve ser acompanhado de testes

mais específicos e sensíveis para a detecção de CAS, já que os microorganismos podem produzir outras substâncias, que não do tipo CAS, capazes de lisar hemácias, assim como alguns CAS podem não promover a hemólise.

Em um estudo com 205 isolados ambientais, diferentes filogeneticamente, Youssef e colaboradores (2004) detectaram 81 isolados que não promoveram a hemólise, porém 31 deles foram positivos para a atividade surfactante, quando avaliados por outros métodos como colapso da gota e espalhamento de óleo. Shavandi e colaboradores (2011) utilizaram a seleção por hemólise juntamente com a medida da tensão superficial para obter uma melhor frequência de microorganismos produtores de compostos ativos de superfície. Das 169 linhagens bacterianas testadas, 42 foram positivas para hemólise, sendo que 12 apresentaram atividade surfactante, de acordo com a medida da tensão superficial.

A formação de halos azuis no meio contendo CTAB-azul de metileno foi negativa para todos os isolados testados, indicando possivelmente a ausência da produção de CAS aniônicos de baixo peso molecular (Walter et al., 2010).

12.3 Avaliação da atividade emulsificante

A produção de agentes emulsificantes foi avaliada determinando-se o índice de emulsificação (E_{24}) dos sobrenadantes das culturas. Os isolados obtidos na biopilha de 30 dias não apresentaram atividade emulsificante após o crescimento em nenhuma das fontes de carbono utilizadas. Para a biopilha de 60 dias, dos 35 isolados testados, apenas 5 apresentaram atividade emulsificante (EH6012, EH6032, EOL6011, F6021, F6033). Esta atividade parece ser dependente da fonte de carbono. O isolado EH6012 apresentou E_{24} de 53,8% quando cultivado em MMB adicionado de glicose. O índice de emulsificação foi negativo para as demais fontes de carbono testadas. O isolado EH6032 apresentou E_{24} de 41,2%, também quando cultivado em meio mineral adicionado de glicose. O isolado EOL6011 apresentou E_{24} de 70,3 % quando cultivado em meio mineral acrescido de óleo diesel. Para as demais fontes de carbono, essa atividade foi negativa. O isolado F6021 foi o único que apresentou atividade emulsificante quando cultivado nas 3 diferentes fontes de carbono. Os índices foram 67,2%, 72,4% e 50% para

óleo diesel, hexadecano e glicose, respectivamente. Para este último isolado, as fontes de carbono hidrofóbicas favoreceram os maiores índices de emulsificação, ao contrário dos demais isolados que produziram compostos emulsificantes quando a fonte de carbono era glicose. O isolado F6033 apresentou o menor índice de emulsificação (24%), correspondente ao cultivo em meio mineral adicionado de hexadecano. Somente 1 isolado da biopilha de 90 dias (F9031) apresentou atividade emulsificante, que foi de 43%.

A atividade emulsificante também variou de acordo com a metodologia de seleção dos isolados. Os índices de emulsificação variaram de 41,5% a 70,3% nos isolados provenientes do enriquecimento, e de 24% a 70,7% para os isolados da flotação.

Muitos trabalhos têm comparado a produção de substâncias emulsificantes provenientes do cultivo com fontes de carbono de diferentes naturezas. O crescimento em hidrocarbonetos induz a síntese de CAS, mas isso não é um pré-requisito para todos os organismos (por exemplo os isolados EH9032, F9021). A mudança no substrato frequentemente pode induzir modificações na estrutura da molécula, alterando assim as propriedades do surfactante. A escolha da fonte de carbono é, então, determinada pela aplicação específica pretendida (Kronenberguer, 2007).

Em um estudo com três linhagens de *Gordonia* sp. Franzetti e colaboradores (2008) verificaram a produção de dois tipos moléculas ativas de superfície. Um bioemulsificante extracelular, capaz de estabilizar emulsões, sintetizado a partir do cultivo em hidrocarbonetos e fontes de carbono solúveis em água, e outro biosurfactante ligado à parede celular, capaz de reduzir a tensão superficial, produzido somente quando na presença de hidrocarbonetos.

Em estudo que avaliou a produção de ramnolipídeos por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* EM1 Wu e colaboradores (2008) estudaram a influência de sete fontes de carbono (glicose, glicerol, sucrose, hexano, óleo de oliva, ácido oléico e óleo de soja), quatro de nitrogênio, e ainda a influência da relação C/N na produção do biosurfactante. As fontes mais favoráveis para a produção e as atividades avaliadas (índice de emulsificação, redução da tensão

superficial) foram glicose e glicerol, indicando que a fonte de carbono preferível é dependente da linhagem.

Quando se observou os valores de crescimento dos respectivos isolados nas diferentes fontes de carbono, nem sempre a fonte que promoveu o maior aumento da biomassa foi a mesma a induzir a produção de CAS. O isolado EH6012, que produziu substância emulsificante somente quando cultivado em glicose, apresentou valores do crescimento para esta fonte (0,154 unidade de D.O a 600 nm) menores em relação aos em óleo diesel e hexadecano, que foram 0,345 e 0,719 respectivamente. A mesma relação foi observada para o isolado EH6032 e F6033 e F9031. Para o isolado EOL6011 os valores de crescimento em óleo diesel, hexadecano e glicose foram próximos (0,306, 0,257 e 0,398, respectivamente) porém somente o cultivo com óleo diesel induziu a produção de CAS. O isolado F6021, apresentou atividade em todas as fontes de carbono testadas e os valores de D.O de 1,302, 1,006 e 1,207 para óleo diesel, hexadecano e glicose respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com alguns encontrados na literatura, que indicam que a fonte de carbono que propicia o aumento da biomassa microbiana, nem sempre será a que irá induzir a produção de CAS. Shavandi e colaboradores (2011) relataram um estudo com a linhagem de *Rhodococcus* sp. TA6, que avaliou o efeito de diferentes fontes de carbono (sucrose, querosene, n-heptano, n-octano, n-hexadecano, n-parafina e gasolina) na produção e na caracterização química do biossurfactante produzido pela linhagem. Sucrose se mostrou como a melhor fonte de carbono para o crescimento microbiano, porém os melhores resultados para a atividade avaliadas (tensão superficial e índice de emulsificação) foram maiores quando a linhagem foi cultivada em meio mineral contendo querosene ou parafina.

12.4 Avaliação da atividade surfactante

A atividade surfactante foi avaliada por meio da determinação do aumento do diâmetro da gota de sobrenadante, em placas de poliestireno. De uma forma geral, a fonte de carbono que mais contribuiu para o aumento no diâmetro da gota de sobrenadante foi o óleo diesel. Os valores variaram de 0 cm a 0,81 cm.

Entretanto, este maior valor foi obtido com o cultivo do isolado EOD6012 em MMB contendo glicose. A análise de variância revelou que esta atividade variou conforme a fonte de carbono utilizada e a linhagem. A influência dos métodos de seleção dos isolados foi estudada com análises de variância em separado.

Para os isolados provenientes do enriquecimento, a fonte de carbono que promoveu uma maior atividade surfactante foi o óleo diesel, seguido da glicose e hexadecano. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as atividades correspondentes aos cultivos, em cada uma das fontes de carbono. As menores atividades surfactantes foram promovidas pelos sobrenadantes das culturas dos isolados EH6036, EH9032, EOL6012 e EOD9032. As maiores pelos isolados EOD3021, EH6031, EOD6013, EOD6012. No desdobramento dos dados, a influência da fonte de carbono sobre a atividade surfactante das linhagens também foi analisada. Em alguns casos, não houve diferença significativa entre as atividades promovidas pelas fontes testadas (isolados EOD9011, EOD9031 e EOD9032), ou a diferença foi observada para apenas duas fontes de carbono (EOD3011, EOL9012 e EOD3013), ou para todas as fontes (EOD6012).

Na avaliação da atividade surfactante dos isolados da flotação, foram observadas algumas diferenças em relação ao método anterior. A fonte de carbono que promoveu uma maior atividade surfactante foi o óleo diesel, seguida da glicose e hexadecano que foram consideradas estatisticamente iguais. As menores atividades surfactantes foram promovidas pelos sobrenadantes das culturas dos isolados F9021, F6025, F6013 e F3024, e as maiores pelos sobrenadantes de F3027, F9031, F3025 e F6021. No desdobramento dos dados, a influência das fontes de carbono sobre a atividade surfactante das linhagens também foi analisada. Em alguns casos, não houve diferença significativa entre as atividades promovidas pelas fontes testadas (F3012, F6034 e F6036), ou a diferença foi observada para apenas duas fontes de carbono (F6035, F9024 e F9032). Para nenhum dos isolados avaliados, as atividades surfactantes foram significativamente diferentes quando consideradas as três fontes de carbono ($p < 0,05$).

Morita e colaboradores (2007) investigaram a produção de glicolípídeos e lipídeos do tipo manosil-eritritol por duas linhagens de leveduras *Pseudozyma antarctica* e

P. aphidis, quando as linhagens foram cultivadas em glicose e glicerol, e avaliaram a atividade surfactante por meio da medida do diâmetro da gota de sobrenadante das culturas em superfícies hidrofóbicas. Os autores observaram que atividade surfactante variou de acordo com a espécie estudada, e a fonte de carbono utilizada para o cultivo. *P. antartica* produziu colapso da gota significativo quando cultivada em glicose, ao passo que *P. aphidis* não produziu.

Considerando todos os fatores avaliados nesta seção, pode-se observar que em alguns casos a presença de hemólise, foi acompanhada das atividades emulsificante e surfactante (EH6032, F6021, F6033 e F9031). O caso do isolado EOD6012 chama a atenção já que a presença de CAS foi detectada pelos teste de índice de emulsificação e atividade surfactante, e não pela hemólise. Esta atividade juntamente com a surfactante são comumente realizadas para verificar a presença de moléculas capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos. Diferentemente, a atividade emulsificante detecta moléculas que atuam na estabilização dos sistemas interfaciais. O que observamos em nosso trabalho e em alguns outros (Wu et al., 2008), é que nenhuma dessas atividades excluem a importância e a utilização das outras. Em um trabalho de prospecção, como o nosso, a realização de diversos testes se faz necessária para obter um maior número de isolados, com potencial de produzir diversos tipos de moléculas ativas de superfície.

Tabela 6: Crescimento, hemólise, índice de emulsificação e atividade surfactante após o cultivo em MMB adicionados de OD, ou H ou G, dos isolados obtidos com o método de enriquecimento.

Isolado	Crescimento			Hemólise			E ₂₄			Atividade surfactante (cm)		
	OD	H	G	OD	H	G	OD	H	G	OD	H	G
Biopilha 30												
EOD3011	0,560 (±0,12) Da ₁	0,785 (±0,13) Da ₁	1,039 (±0,07) Da ₁	-	-	+	-	-	-	0,21 (±0,02) Ba ₂	0,03 (±0,03) Aa ₁	0,02 (±0,02) Aa ₁
EOD3012	0,259 (±0,02) Ba ₁	0,146 (±0,01) Ba ₁	0,8135 (±0,05) Ba ₂	+	+	+	-	-	-	0,09 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,02 (±0,02) a ₁
EOD3013	0,249 (±0,05) Aa ₁	0,032 (±0,00) Aa ₁	0,051 (±0,05) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,17 (±0,00) Ba ₂	0,03 (±0,00) Aa ₁	0,03 (±0,00) Aa ₁
EOD3021	0,579(±0,17) Ba ₁	0,038(±0,00) Ba ₁	0,038(±0,00) Ba ₁	-	+	-	-	-	-	0,31 (±0,12) Ca ₂	0,13 (±0,10) Ba ₁	0,15 (±0,05) Ba ₁
EOD3022	0,549 (±0,08) Ca ₁	0,685 (±0,13) Ca ₁	0,783 (±0,02) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,19 (±0,00) Ba ₂	0,06 (±0,02) Aa ₁	0,02 (±0,02) Aa ₁
EOD3031	0,592 (±0,01) Ca ₁	0,689 (± 0,03) Ca ₁	0,846 (±0,02) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,12 (±0,00) Aa ₁	0,06 (±0,02) Aa ₁	0,09 (±0,05) Aa ₁
EOD3032	0,363 (±0,01) Ba ₁	0,359 (±0,00) Ba ₁	0,360 (±0,04) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,14 (±0,00) Aa ₂	0,02 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
EH3021	0,983 (±0,04) Da ₁	1,019 (±0,03) Da ₁	0,700 (±0,06) Da ₁	-	+	-	-	-	-	0,13 (±0,11) Aa ₂	0 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
EOL3011	0,321 (±0,01) Aa ₁	0,214 (±0,01) Aa ₁	0,172 (±0,01) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,13 (±0,06) Aa ₁	0,22 (±0,15) Aa ₁	0,17 (±0,02) Ba ₁

EOL3021	0,508 ($\pm 0,11$) Ba ₁	0,386 ($\pm 0,25$) Ba ₁	0,279 ($\pm 0,07$) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,11 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,05 ($\pm 0,05$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EOL3022	0,244 ($\pm 0,00$) Ba ₁	0,244 ($\pm 0,00$) Ba ₁	0,616 ($\pm 0,03$) Ba ₁	-	+	+	-	-	-	0,10 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
Biopilha 60												
EOD6011	0,165 ($\pm 0,02$) Ba ₁	0,632 ($\pm 0,22$) Ba ₂	0,203 ($\pm 0,01$) Ba ₁	+	+	+	-	-	-	0,32 ($\pm 0,04$) Ca ₂	0,04 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EOD6012	0,336 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,152 ($\pm 0,03$) Aa ₁	0,076 ($\pm 0,00$) Aa ₁	-	-	-	-	-	53,8 % ($\pm 0,02$)	0,22 ($\pm 0,00$) Ba ₂	0,04 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,81 ($\pm 0,00$) Ca ₃
EOD6013	0,537 ($\pm 0,04$) Ba ₁	0,205 ($\pm 0,01$) Ba ₁	0,619 ($\pm 0,15$) Ba ₁	-	+	-	-	-	-	0,32 ($\pm 0,02$) Ca ₂	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,26 ($\pm 0,26$) Ba ₂
EOD6021	0,260 ($\pm 0,08$) Ca ₁	0,524 ($\pm 0,19$) Ca ₁	0,929 ($\pm 0,09$) Ca ₂	-	+	-	-	-	-	0,37 ($\pm 0,02$) Ca ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EH6011	0,393 ($\pm 0,10$) Ba ₁	0,633 ($\pm 0,05$) Ba ₁	0,124 ($\pm 0,04$) Ba ₁	-	-	+	-	-	-	0,22 ($\pm 0,15$) Ba ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,06 ($\pm 0,06$) Aa ₁
EH6012	0,345 ($\pm 0,11$) Ba ₁	0,719 ($\pm 0,10$) Ba ₂	0,154 ($\pm 0,01$) Ba ₁	+	-	+	-	-	-	0,10 ($\pm 0,06$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,25 ($\pm 0,08$) Ba ₂
EH6021	0,549 ($\pm 0,19$) Da ₁	0,359 ($\pm 0,01$) Da ₁	1,732 ($\pm 0,02$) Da ₂	-	-	-	-	-	-	0,25 ($\pm 0,00$) Ba ₂	0,23 ($\pm 0,10$) Ba ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EH6031	0,640 ($\pm 0,08$) Ea ₁	1,050 ($\pm 0,62$) Ea ₁	1,685 ($\pm 0,04$) Ea ₁	-	-	-	-	-	-	0,31 ($\pm 0,02$) Ca ₂	0,23 ($\pm 0,02$) Ba ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EH6032	0,300 ($\pm 0,07$) Ca ₁	1,196 ($\pm 0,02$) Ca ₂	0,892 ($\pm 0,37$) Ca ₂	-	+	+	-	-	41,5% ($\pm 0,02$)	0,21 ($\pm 0,10$) Ba ₂	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁

EH6033	0,342 ($\pm 0,16$) Ba ₁	0,378 ($\pm 0,00$) Ba ₁	0,843 ($\pm 0,04$) Ba ₂	-	-	-	-	-	-	0,09 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,06 ($\pm 0,06$) Aa ₁
EH6034	0,125 ($\pm 0,01$) Aa ₁	0,181 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,059 ($\pm 0,01$) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,16 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,08 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EH6035	0,973 ($\pm 0,13$) Da ₁	1,020 ($\pm 0,00$) Da ₁	0,998 ($\pm 0,05$) Da ₁	+	+	+	-	-	-	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁
EH6036	0,602 ($\pm 0,19$) Ca ₁	0,435 ($\pm 0,11$) Ca ₁	1,369 ($\pm 0,01$) Ca ₂	+	+	+	-	-	-	0,07 ($\pm 0,07$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁
EOL6011	0,306 ($\pm 0,05$) Aa ₁	0,127 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,398 ($\pm 0,32$) Aa ₁	-	-	-	70,3% ($\pm 0,00$)	-	-	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EOL6012	1,353 ($\pm 0,00$) Ba ₂	0,328 ($\pm 0,30$) Ba ₁	0,110 ($\pm 0,02$) Ba ₁	-	-	+	-	-	-	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁
EOL6031	0,059 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,084 ($\pm 0,01$) Aa ₁	0,068 ($\pm 0,01$) Aa ₁	-	-	-	-	-	-	0,14 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,07 ($\pm 0,04$) Aa ₁
Biopilha 90												
EOD9011	1,092 ($\pm 0,60$) Ca ₂	0,364 ($\pm 0,03$) Ca ₁	0,802 ($\pm 0,11$) Ca ₂	-	-	+	-	-	-	0,09 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) a ₁	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁
EOD9022	0,131 ($\pm 0,06$) Aa ₁	0,136 ($\pm 0,06$) Aa ₁	0,065 ($\pm 0,00$) Aa ₁	-	-	-	-	-	-	0,06 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁
EOD9031	0,716 ($\pm 0,41$) Ca ₁	0,727 ($\pm 0,05$) Ca ₁	0,477 ($\pm 0,32$) Ca ₂	-	-	-	-	-	-	0,11 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,06 ($\pm 0,06$) Aa ₁
EOD9032	0,100 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,250 ($\pm 0,01$) Aa ₁	0,176 ($\pm 0,05$) Aa ₁	-	-	+	-	-	-	0,03 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁

EH9013	0,311 ($\pm 0,12$) Ba ₁	0,236 ($\pm 0,02$) Ba ₁	0,552 ($\pm 0,19$) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,07 ($\pm 0,07$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁
EH9021	1,010 ($\pm 0,17$) Ca ₂	0,560 ($\pm 0,11$) Ca ₁	0,221 ($\pm 0,00$) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
EH9022	0,174 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,088 ($\pm 0,01$) Aa ₁	0,132 ($\pm 0,00$) Aa ₁	-	-	-	-	-	-	0,14 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,07 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁
EH9031	0,634 ($\pm 0,13$) Ca ₁	0,857 ($\pm 0,58$) Ca ₁	0,370 ($\pm 0,03$) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,08 ($\pm 0,08$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,13 ($\pm 0,02$) Ba ₁
EH9032	1,632 ($\pm 0,31$) Ea ₃	1,179 ($\pm 0,39$) Ea ₂	0,344 ($\pm 0,01$) Ea ₁	-	-	-	-	-	-	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁
EOL9011	0,327 ($\pm 0,17$) Ba ₁	0,479 ($\pm 0,01$) Ba ₁	0,364 ($\pm 0,25$) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,05 ($\pm 0,05$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,13 ($\pm 0,02$) Ba ₁
EOL9012	0,122 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,186 ($\pm 0,08$) Aa ₁	0,107 ($\pm 0,01$) Aa ₁	-	-	-	-	-	-	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,07 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,19 ($\pm 0,02$) Ba ₂
EOL9013	0,700 ($\pm 0,09$) Ca ₁	0,752 ($\pm 0,09$) Ca ₁	0,684 ($\pm 0,01$) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,06 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁
EOL9014	1,647 ($\pm 0,08$) Ea ₂	1,135 ($\pm 0,03$) Ea ₁	0,849 ($\pm 0,02$) Ea ₁	-	-	-	-	-	-	0,09 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,12 ($\pm 0,12$) Aa ₁	0,03 ($\pm 0,00$) Aa ₁

Legenda: MMB-Meio Mineral para bactérias; OD-óleo diesel; H- hexadecano; G-glicose. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, e minúsculas seguidas de números na mesma linha, foram considerados estatisticamente iguais, com nível mínimo de significância de 0,05 pelo Teste de Scott-Knott.

Tabela 7: Crescimento, hemólise, índice de emulsificação e atividade surfactante após o cultivo em MMB adicionados de OD, H ou G (1% v/v) dos isolados obtidos com o método de flotação.

Biopilha	Isolado	Crescimento			Hemólise			E ₂₄			Atividade surfactante		
		OD	H	G	OD	H	G	OD	H	G	OD	H	G
30	F3012	0,582 (±0,11) Ca ₁	0,563 (±0,20) Ca ₁	0,471 (±0,02) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,02 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,04 (±0,04) Aa ₁
	F3015	1,164 (±0,18) Da ₂	1,092 (±0,45) Da ₂	0,259 (±0,01) Da ₁	-	-	-	-	-	-	0,28 (±0,00) Ba ₂	0,08 (±0,00) Aa ₁	0,04 (±0,00) Aa ₁
	F3019	0,694 (±0,02) Ca ₁	0,606 (±0,04) Ca ₁	0,475 (±0,17) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,12 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,02 (±0,02) Aa ₁
	F3022	0,247 (±0,03) Ba ₁	0,467(±0,14) Ba ₁	0,421(±0,06) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,15 (±0,00) Ba ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,08 (±0,08) Aa ₁
	F3023	0,885 (±0,32) Ca ₁	0,626 (±0,02) Ca ₁	0,589 (±0,00) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,05 (±0,02) Aa ₁	0,02 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
	F3024	0,789 (±0,02) Ca ₁	0,621 (±0,02) Ca ₁	0,611 (±0,05) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,05 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
	F3025	0,595 (±0,10) Ca ₁	0,359 (±0,00) Ca ₁	0,959 (±0,21) Ca ₂	-	-	-	-	-	-	0,21 (±0,14) Ba ₂	0 (±0,00) Aa ₁	0,26 (±0,05) Ba ₂
	F3026	1,241 (±0,12) Da ₂	0,774 (±0,06) Da ₁	0,788 (±0,00) Da ₁	-	-	-	-	-	-	0,06 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
	F3027	0,443 (±0,05) Ba ₁	0,214 (±0,01) Ba ₁	0,770 (±0,00) Ba ₂	+	-	+	-	-	-	0,17 (±0,02) Ba ₂	0 (±0,00) Aa ₁	0,26 (±0,07) Ba ₂

60

F3033	0,282 ($\pm 0,12$) Ba ₁	0,318 ($\pm 0,06$) Ba ₁	0,754 ($\pm 0,08$) Ba ₁	+	-	+	-	-	-	0,13 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6011	0,303 ($\pm 0,03$) Aa ₁	0,201 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,058 ($\pm 0,01$) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,12 ($\pm 0,08$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6013	1,243 ($\pm 0,24$) Ca ₂	0,449 ($\pm 0,01$) Ca ₁	0,257($\pm 0,02$) Ca ₁	+	+	+	-	-	-	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6014	0,386 ($\pm 0,21$) Aa ₁	0,341 ($\pm 0,06$) Aa ₁	0,076 ($\pm 0,01$) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,05 ($\pm 0,05$) Aa ₁	0,11 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6015	1,006 ($\pm 0,06$) Da ₂	1,618 ($\pm 0,01$) Da ₃	0,073 ($\pm 0,02$) Da ₁	-	+	+	-	-	-	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0,21 ($\pm 0,08$) Ba ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6016	0,043 ($\pm 0,10$) Ca ₁	1,225 ($\pm 0,50$) Ca ₂	0,371 ($\pm 0,10$) Ca ₁	-	+	+	-	-	-	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6017	0,345 ($\pm 0,22$) Aa ₁	0,210 ($\pm 0,05$) Aa ₁	0,098 ($\pm 0,01$) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,18 ($\pm 0,07$) Ba ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,04$) Aa ₁
F6018	0,181 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,136 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,115 ($\pm 0,00$) Aa ₁	+	+	+	-	-	-	0,12 ($\pm 0,08$) Aa ₁	0,27 ($\pm 0,27$) Ba ₂	0 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6021	1,302 ($\pm 0,31$) Ea ₁	1,006 ($\pm 0,05$) Ea ₁	1,207($\pm 0,16$) Ea ₁	+	+	+	67,2% ($\pm 0,07$)	70,7% ($\pm 0,02$)	50% ($\pm 0,00$)	0,19 ($\pm 0,00$) Ba ₁	0,07 ($\pm 0,00$) a ₁	0,30 ($\pm 0,26$) Ba ₂
F6022	0,388 ($\pm 0,03$) Ca ₁	0,622 ($\pm 0,04$) Ca ₁	0,796 ($\pm 0,00$) Ca ₁	-	-	-	-	-	-	0,19 ($\pm 0,00$) Ba ₁	0,10 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁
F6023	0,977 ($\pm 0,24$) Ba ₁	0,562 ($\pm 0,03$) Ba ₁	0,813 ($\pm 0,04$) Ba ₁	+	+	+	-	-	-	0,21 ($\pm 0,02$) Ba ₁	0,12 ($\pm 0,08$) Aa ₁	0,04 ($\pm 0,00$) Aa ₁
F6024	0,507 ($\pm 0,25$)	0,091 ($\pm 0,03$)	0,583 ($\pm 0,56$)	+	+	+	-	-	-	0,28	0	0,02

	Ba ₂	Ba ₁	Ba ₂							(±0,02) Ba ₂	(±0,00) Aa ₁	(±0,02) Aa ₁
F6025	0,160 (±0,04) Aa ₁	0,135 (±0,02) Aa ₁	0,118 (±0,02) Aa ₂	+	+	+	-	-	-	0,02 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
F6026	0,492 (±0,39) Ba ₁	0,109 (±0,01) Ba ₁	1,369 (±0,01) Ba ₁	+	-	+	-	-	-	0,10 (±0,10) a ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,08 (±0,08) Aa ₁
F6031	0,214 (±0,06) Aa ₁	0,175 (±0,00) Aa ₁	0,265 (±0,03) Aa ₁	+	-	-	-	-	-	0,29 (±0,10) Ba ₂	0 (±0,00) Aa ₁	0,02 (±0,02) Aa ₁
F6032	0,957 (±0,06) Ba ₂	0,128 (±0,00) Ba ₁	0,188 (±0,01) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,19 (±0,00) Ba ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,04 (±0,00) Aa ₁
F6033	0,420 (±0,00) Ba ₁	0,388 (±0,03) Ba ₁	0,237 (±0,02) Ba ₁	+	+	-	24% (±0,00)	-	-	0,15 (±0,04) Ba ₁	0,04 (±0,00) Aa ₁	0,06 (±0,06) Aa ₁
F6034	0,993 (±0,41) Da ₁	0,878 (±0,22) Da ₁	0,789 (±0,13) Da ₁	-	+	+	-	-	-	0,06 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁	0,10 (±0,02) Aa ₁
F6035	0,146 (±0,01) Aa ₁	0,303 (±0,03) Aa ₁	0,090 (±0,09) Aa ₁	+	+	-	-	-	-	0 (±0,00) Aa ₁	0,11 (±0,11) Aa ₂	0 (±0,00) Aa ₁
F6036	0,459 (±0,03) Ba ₁	0,700 (±0,07) Ba ₁	0,269 (±0,02) Ba ₁	-	-	-	-	-	-	0,07 (±0,07) Aa ₁	0 (±0,04) Aa ₁	0,13 (±0,00) Aa ₁
90	F9016	0,843 (±0,03) Ca ₁	0,655 (±0,07) Ca ₁	0,525 (±0,10) Ca ₁	-	-	-	-	-	0,07 (±0,00) Aa ₁	0,09 (±0,02) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁
	F9021	0,435 (±0,01) Ca ₁	0,785 (±0,01) Ca ₁	0,408 (±0,04) Ca ₁	-	-	-	-	-	0 (±0,00) Aa ₁	0 (±0,00) a ₁	0 (±0,00) Aa ₁
	F9024	0,212 (±0,13) Aa ₁	0,569 (±0,09) Aa ₁	0,629 (±0,01) Aa ₁	-	-	-	-	-	0,26 (±0,05) Ba ₂	0,05 (±0,05) Aa ₁	0 (±0,00) Aa ₁

F9031	0,820 ($\pm 0,06$) Ba ₂	0,213 ($\pm 0,00$) Ba ₁	0,131 ($\pm 0,00$) Ba ₁	+	+	+	-	-	43% ($\pm 0,00$)	0,18 ($\pm 0,06$) Ba ₁	0,19 ($\pm 0,04$) Ba ₁	0,08 ($\pm 0,04$) Aa ₁
F9032	0,154 ($\pm 0,08$) Ca ₂	0,412 ($\pm 0,07$) Ca ₁	0,322 ($\pm 0,07$) Ca ₁	+	+	+	-	-	-	0,02 ($\pm 0,02$) Aa ₁	0,07 ($\pm 0,07$) Aa ₁	0,18 ($\pm 0,11$) Ba ₁

Legenda: MMB-Meio Mineral para bactérias; OD-óleo diesel; H- hexadecano; G-glicose. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, e minúsculas seguidas de números na mesma linha, foram considerados estatisticamente iguais, com nível mínimo de significância de 0,05 pelo Teste de Scott-Knott.

13 Ensaio de de-emulsificação

13.1 Avaliação da atividade de-emulsificante

Alguns isolados que apresentaram atividade de hemólise em ágar sangue foram testados quanto à capacidade de promover a separação das fases óleo e solução aquosa em emulsões A/O. Para a emulsão Span80-querosene, os tubos após serem inoculados com as frações da cultura mostraram uma clara separação de fases; na parte superior uma fase de querosene, uma fase mediana na interface e uma fase aquosa no fundo do tubo. O volume da fase mediana foi então quantificado e a de-emulsificação determinada em porcentagem.

A atividade de-emulsificante dos isolados variou em relação à fonte de carbono utilizada para o crescimento prévio ao teste, e também em relação à idade da biopilha de origem dos isolados. A tabela 9 mostra a diminuição da altura da camada emulsionada. Dentre os 13 isolados testados, a atividade de-emulsificante variou de 0 a 94%. A fonte de carbono que promoveu as maiores taxas de de-emulsificação foi a glicose. Analisando-se a biopilha de origem dos isolados, para as de 30, 60 e 90 dias os isolados apresentaram melhor atividade quando cultivados em glicose. Em alguns casos atividade de-emulsificante foi 0 quando cultivado em óleo diesel e foi de 94% quando cultivado em glicose (isolado: EOD3013).

Vários trabalhos têm demonstrado que a fonte de carbono presente no meio de cultivo pode influenciar a atividade de-emulsificante das culturas microbianas. Nadarajah e colaboradores (2002) utilizando uma cultura mista de bactérias observaram que as culturas cultivadas em óleo cru ou óleo de motor 10W30 apresentaram atividades de-emulsificantes de uma emulsão modelo água-querosene semelhante, 96 %. O cultivo em meio contendo óleo de colza promoveu uma atividade de 80 %. Já o cultivo em substratos hidrofílicos, como a glicose, amido e sacarose, promoveu as menores taxas de de-emulsificação, com valores inferiores a 80 %. Foi sugerido pelos autores que a alta produção de componentes associados à célula ou biossurfactantes responsáveis pela atividade de-emulsificante foi induzida pelos hidrocarbonetos constituintes do

petróleo. Liu e colaboradores (2010) também estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de um de-emulsificante produzido pela linhagem *Alcaligenes* sp. S-XJ-1. Após o cultivo em lactose, sucrose, amido, acetato de sódio e citrato de sódio, como fontes hidrofílicas, e em vários óleos vegetais (amendoim, girassol, canola, palmeira, soja), os autores encontraram melhores taxas de de-emulsificação quando a linhagem foi cultivada nas fontes hidrofóbicas (óleos). Entretanto em nosso estudo encontrou-se uma boa taxa de quebra de emulsão quando os isolados foram cultivados em glicose (94%).

Tabela 9: Diminuição da altura da camada de emulsão pela inoculação de cultura dos isolados, cultivados em MMB acrescidos de óleo diesel ou glicose (1% v/v), em emulsão modelo Span 80- querosene (1:1)

Isolados	Óleo diesel				Glicose			
	H emulsionada	H óleo	H solução aquosa	%DE	H emulsionada	H óleo	H solução aquosa	%DE
EOD3012	0,8 (±0,1)	1,1 (±0,00)	1 (±0,0)	56	0,2 (±0,0)	1,05 (±0,05)	1,55 (±0,05)	89
EOD3013	1,8 (±0,1)	1 (±0,0)	0 (±0,0)	0	0,1 (±0,0)	1,05 (±0,05)	1,5 (±0,00)	94
EOL3011	1,8 (±0,1)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0	1,8 (±0,1)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0
EOL3022	1,8 (±0,1)	1 (±0,00)	0 (±0,0)	0	0,2 (±0,0)	1,15 (±0,05)	1,55 (±0,05)	89
F3027	1,8 (±0,1)	0,95 (±0,05)	0 (±0,0)	0	0,25 (±0,05)	1,05 (±0,05)	1,5 (±0,00)	86
F6011	0,85 (±0,15)	1 (±0,02)	0 (±0,00)	53	1,8 (±0,1)	1 (±0,0)	0 (±0,00)	0
F6016	1,8 (±0,1)	1 (±0,00)	0 (±0,00)	0	1,15 (±0,05)	1 (±0,00)	0,65 (±0,05)	36
F6017	1,8 (±0,1)	1 (±0,00)	0 (±0,00)	0	1,65 (±0,15)	1,15 (±0,05)	0,05 (±0,05)	8
F6018	1,8 (±0,1)	1 (±0,00)	0 (±0,00)	0	1,1 (±0,2)	1,15 (±0,05)	0,65 (±0,15)	39
F6025	1,5 (±0,2)	1,05 (±0,05)	0,35 (±0,15)	17	1,8 (±0,1)	1,15 (±0,05)	0,05 (±0,05)	0
F6026	1,3 (±0,1)	0,95 (±0,05)	0,25 (±0,05)	28	1,1 (±0,1)	1,05 (±0,05)	0,7 (±0,2)	39
F6031	1,25 (±0,15)	1,05 (±0,05)	0,55 (±0,15)	31	1,05 (±0,05)	1,1 (±0,1)	0,75 (±0,05)	42
F6035	1,75 (±0,05)	1 (±0,00)	0,00 (±0,00)	3	0,7 (±0,0)	1,15 (±0,05)	1,05 (±0,05)	61

Controle: camada emulsionada: 1,8 ($\pm 0,00$); Legenda: H- altura da camada emulsionada; OD-óleo diesel; G-glicose

As taxas de separação das fases oleosa e aquosa também foram medidas, com o intuito de entender a dinâmica da de-emulsificação. Para todas as emulsões analisadas, a separação da fase oleosa (querosene) não ocorreu simultaneamente à separação da fase aquosa (solução de Span 80). Primeiramente, se observou a separação da fase oleosa. A fase aquosa começava a se separar depois, e ao final do período de sete dias a altura dessas fases foi determinada. Huang e colaboradores (2009) também observaram o mesmo padrão de separação, em um estudo de de-emulsificação com uma cultura de *Alcaligenes* sp. em emulsão do tipo água em óleo, como a de nosso estudo. A fase contínua da emulsão se agrega e separa antes da fase dispersa. Provavelmente o fato de estar em maior quantidade possibilita uma interação mais rápida com as culturas das células, desencadeando todo o processo de desestabilização da emulsão.

13.2 Estudo da hidrofobicidade celular dos isolados com atividade de-emulsificante

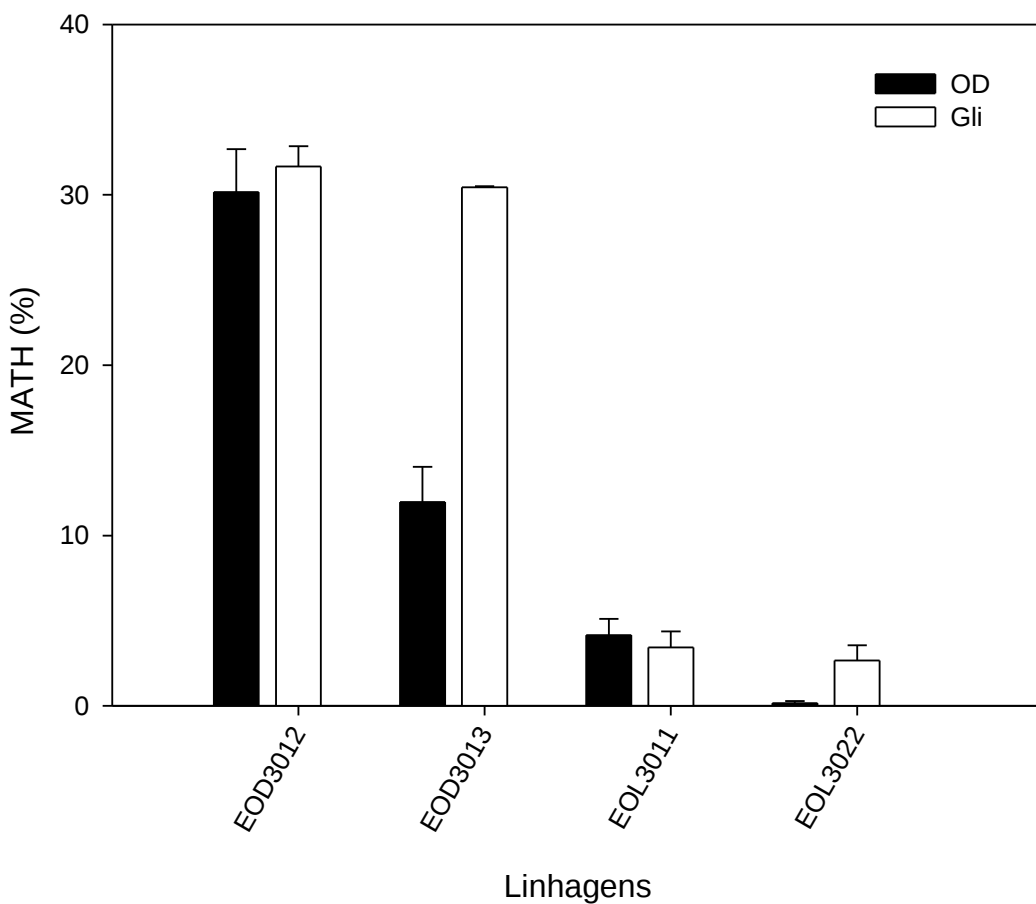
Os dados da hidrofobicidade celular se encontram na figura 9 (A e B). A hidrofobicidade variou conforme os isolados, o método de seleção e a fonte de carbono utilizada no crescimento. Para a maioria dos resultados, a hidrofobicidade foi maior quando o cultivo ocorreu em óleo diesel. Entretanto, alguns isolados apresentaram hidrofobicidade maior quando cultivados em glicose. Para estes últimos resultados não são encontrados similares na literatura. No geral, a hidrofobicidade foi maior nos isolados obtidos com a flotação. Porém não houve correspondências com os maiores valores de quebra de emulsão.

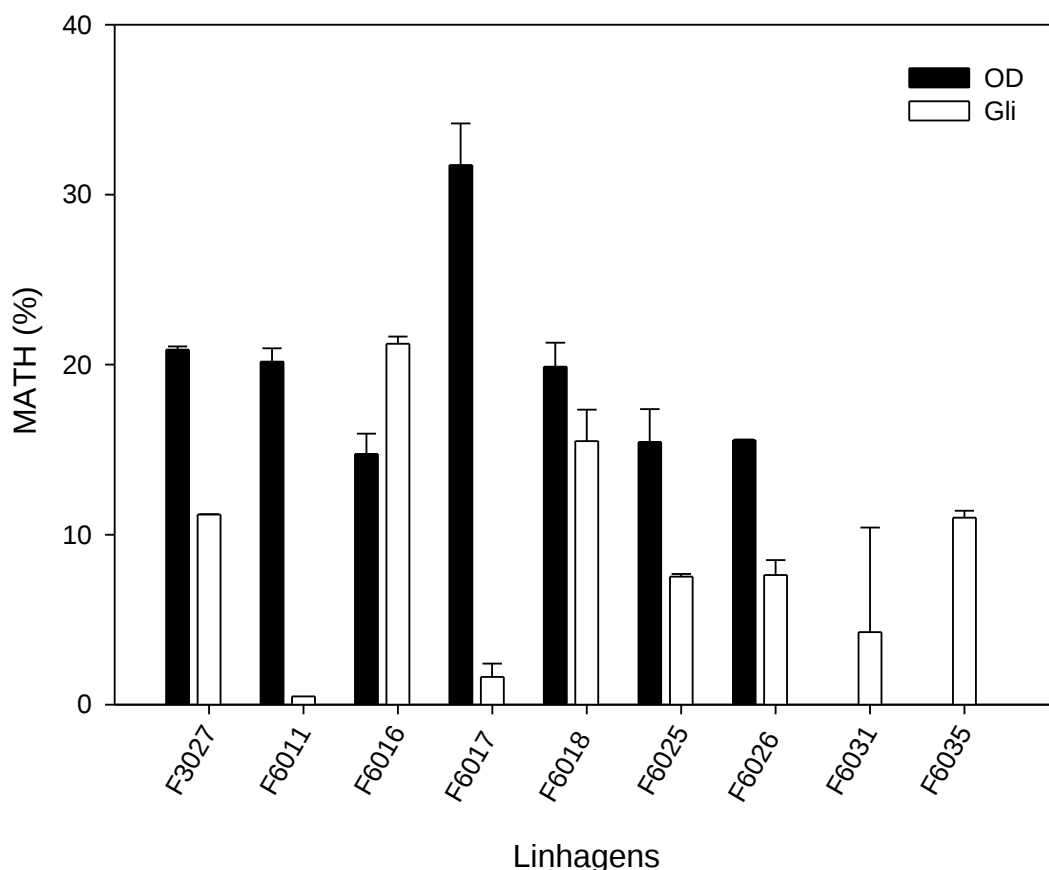
As características superficiais tem sido relatadas como importantes para as capacidades emulsificantes e de-emulsificantes. Nos isolados obtidos com o enriquecimento, observou-se uma maior hidrofobicidade dos isolados Gram-negativos. Já na flotação os isolados Gram-positivos apresentaram valores maiores. Liu e colaboradores (2011) observaram que a redução da hidrofobicidade celular pode ser acompanhada de uma aumento na carga

negativa na superfície celular em linhagens de-emulsificantes. Provavelmente, as diferenças de resultados para as mesmas linhagens podem ser decorrentes das diferenças nas cargas superficiais da parede celular. Esta variável é influenciada por fatores como a fonte de carbono, pH. Estes dados podem ser confirmados se analisarmos o potencial zeta das células. Com esse parâmetro seria possível caracterizar melhor a hidrofobicidade das células em estudo.

Figura 9: Hidrofobicidade das linhagens isoladas pela técnica do enriquecimento (A) e pela técnica de flotação (B) cultivadas em meio mineral adicionado de óleo diesel e glicose.

(A)





14 Identificação dos isolados obtidos com os diferentes métodos de seleção

A amplificação do fragmento do gene rDNA 16S foi realizada com sucesso em isolados empregando os iniciadores 8F e 907R. Na análise por eletroforese em gel de agarose 1,0 %, foi observado que o produto de PCR de todos os isolados bacterianos apresentaram o mesmo tamanho de banda esperado, aproximadamente 1000 pb. A técnica de sequenciamento foi realizada para identificar o gênero ou até mesmo a espécie dos isolados obtidos por meio da comparação das sequências estudadas com as depositadas no Genbank. Foi utilizada somente a sequência “forward” para a comparação inicial no banco de dados. Posteriormente, as sequências “forward” e “reverse” serão alinhadas para gerar as sequências consenso, que serão então comparadas novamente e darão o resultado definitivo do sequenciamento. Dos 48 isolados enviados para o sequenciamento somente 16 foram identificados. Os resultados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Sequenciamento da região 16S do rDNA dos isolados obtidos com os métodos de enriquecimento e flotação, utilizando os iniciadores 8F e 907R.

<i>Biopilha</i>	<i>Isolado</i>	<i>Pb</i> ^{1/}	<i>Identificação</i>	<i>Score</i>	<i>Identidade</i>
30 dias	EOD3012	494/91	<i>Stenotrophomonas</i> sp	725	95%
	EOD3031	493/87	<i>Paracoccus</i> sp	381	94%
	EOL3022	474/90	<i>Bacillus</i> sp.	416	91%
	EOD6021	166/87	<i>Citrobacter</i> sp	204	95%
	EH6011	302/92	<i>Bacillus</i> sp.	438	94%
	EH6012	160/82	<i>Pseudomonas</i> sp.	156	88%
	EH6021	170/91	<i>Bacillus</i> sp.	248	95%
60 dias	EH6031	157/84	<i>Bacillus</i> sp.	91,7	94%
	F6011	691/91	<i>Bacillus</i> sp.	1002	94%
	F6014	150/85	<i>Bacillus</i> sp.	193	94%
	F6015	188/83	<i>Bacillus</i> sp.	178	87%
	F6016	326/90	<i>Bacillus</i> sp.	387	94%
	F6017	157/94	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	278	99%
	F6024	191/85	<i>Nocardioides</i> sp.	139	85%
90 dias	F6034	157/87	<i>Bacillus</i> sp.	167	96%
90 dias	F9033	264/92	<i>Bacillus</i> sp.	353	97%

1/ Pb = número de pares de base da sequência

Ao todo foram identificados 7 gêneros diferentes. O gênero mais predominantes foi *Bacillus* sp., representado por 10 isolados, os demais gêneros tiveram apenas 1 isolado cada.

Espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* têm sido frequentemente recuperadas de ambientes contaminados com petróleo, e muitas vezes apresentam altas taxas de degradação de hidrocarbonetos (Das et al., 2007). Esses micro-organismos costumam ser produtores de moléculas ativas de superfície. Uma das moléculas com a mais alta atividade de superfície conhecida é a surfactina, produzida pela espécie *Bacillus subtilis*. Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por produzirem uma gama de compostos ativos de superfície, comumente conhecidos como ramnolipídeos, e que tem sido empregadas na biorremediação de solos contaminados com derivados do petróleo (Wu et al., 2008).

No gênero *Paracoccus* são relatadas espécies denitrificantes, presentes em solos (Kniemeyer et al., 1999). Jeon e colaboradores (2011) relataram o isolamento de *Paracoccus* sp. a partir de culturas de enriquecimento com

hidrocarbonetos voláteis.

O gênero *Stenotrophomonas* tem sido isolado de ambientes contendo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Molina et al., 2009). A linhagem *S. maltophila* já foi caracterizada como capaz de utilizar uma gama de compostos orgânicos como fonte de carbono, incluindo alcanos, fenóis clorinados, dentre outros. São micro-organismos desejáveis para serem utilizados em biorremediação, já que muitos sítios com derivados do petróleo são comumente contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Juhász et al., 1998).

O gênero *Nocardioides* sp. já foi isolado de ambientes contaminados com óleos, e comumente se encontra a presença das enzimas monooxigenases, conhecidas por seu papel na oxidação de compostos orgânicos como alcanos, alcenos, hidrocarbonetos aromáticos (Sayavedra-Soto et al., 2011). A linhagem *Nocardioides* sp. CF8 já foi relatada na literatura com a capacidade de crescer em presença de uma ampla faixa de hidrocarbonetos (C2 a C16), butano, álcoois primários, ácidos carboxílicos e fenol (Hamamura et al., 2000).

Para o gênero *Citrobacter* não foram encontradas referências relacionando esse gênero à produção de compostos ativos de superfície. As espécies do gênero são comumente associadas ao trato gastrointestinal de mamíferos. Kwan Oh e colaboradores (2003) relataram o isolamento de uma linhagem *Citrobacter* sp. Y19 isolada de um digestor anaeróbio de lodo de tratamento de água, capaz de produzir H₂ a partir da fermentação da glicose.

Para o gênero *Staphylococcus* também não foram encontradas referências relacionando esse gênero à produção de compostos ativos de superfície.

15 CONCLUSÕES

-A amostragem nas biopilhas de decomposição com produtos oleosos mostrou-se adequada para a obtenção de bactérias produtoras de compostos ativos de superfície.

-Foi possível determinar a população heterotrófica total e degradadora utilizando a técnica de número mais provável. Para a primeira, os valores foram da ordem de 10^7 NMP/g amostra. Já a população degradadora variou de 10^3 a 10^7 NMP/g amostra. Os menores valores populacionais foram da população degradadora de hexadecano e os maiores da população degradadora de óleo Daido-Dairol PA-5A.

-Diversidade metabólica da comunidade presente nas amostras da biopilha foi estudada. Este parâmetro foi considerado alto já que as amostras foram capazes de consumir pelo menos 29, das 31 fontes de carbono testadas.

-As técnicas de enriquecimento e flotação foram suficientes para a obtenção dos isolados. Ao todo foram obtidos 74 isolados.

-Os isolados selecionados foram capazes de crescer em meio mineral adicionado de diferentes fontes de carbono (óleo diesel, hexadecano e glicose), apresentando diferentes valores de densidade ótica a 600nm, de acordo com a fonte em questão.

-Vários isolados foram capazes de produzir compostos ativos de superfície a partir do cultivo nos diferentes meios de cultura. Os compostos encontrados foram do tipo surfactantes e emulsificantes.

-Alguns isolados testados para hemólise, foram também avaliados quanto à quebra de emulsões. Essa atividade variou conforme a linhagem e a fonte de carbono em que foram cultivados.

-A hidrofobicidade não se correlacionou com as taxas de quebra de emulsão.

-Alguns isolados foram identificados em um sequenciamento da região 16S do rDNA. Os gêneros encontrados foram *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Pseudomonas* sp., *Nocardioides* sp., *Citrobacter* sp., e *Staphylococcus* sp.

16 PERSPECTIVAS

Considerando-se os resultados obtidos até o momento, este trabalho possui como perspectivas:

-Avaliação da natureza química dos compostos emulsificantes produzidos pelos isolados.

-Estudo da diversidade genética das populações presentes nas biopilhas.

-Estudo da produção de alguns compostos ativos de superfície por alguns isolados.

-Estudo das características da superfície celular dos isolados com capacidade de-emulsificante.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ângulo de contato (figura): <http://www.attension.com/?id=1092&cid=>

AL-TAHHAN, R.A.; SANDRIN, T.R.; BODOUR, A. A., MAIER R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 3262-3268, 2000.

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A.R.; Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 3024-3032, 2009.

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

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, v.97, p. 868-875, 2006.

BECKER, P.M. About the order in aerobic heterotrophic microbial communities from hydrocarbon-contaminated sites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 43, p. 135-146, 1999.

BELLON-FONTAINE; RAULT, J.; VAN OSS, C.J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloid and surfaces B: Biointerfaces*, v. 7, p. 47-53, 1996.

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

BREDHOLT, H.; JOSEFSEN, K.; VATLAND, A.; BRUHEIM, P.; EIMHJELLEN, K. Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. *Canadian Journal of Microbiology*, V. 44(4), p. 330-340, 1998.

BRIONES, A. et al, Estimating microbial population counts by 'most probable number' using Microsoft Excel. *Journal of Microbiological Methods*, v. 35, p.157-161, 1999.

BRISSOLARI, A. Estudo da Molhabilidade em Madeiras Tropicais ou de Reflorestamento por Medidas de Ângulo de Contato e de Permeabilidade, Universidade de São Paulo, 2008.

CAIRNS, L.; COOPER, D.G; ZAJIC, J.E; WOOD, J. M; KOSARIC N. Characterization of *Nocardia amarae* as potent biological coalescing agent of

water-in-oil emulsions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, p. 362-366, 1982.

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

CAMEOTRA, S.S.; SINGH, P. Syntesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, v.8, 2009.

CAMERON, D.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The Mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* Is an Effective Bioemulsifier. *Applied Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1420-142, 1988.

CARRILO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.J.; GIULIETTI, A. M., Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal. of Microbiology and Biotechnology*, v. 12, p. 82-84, 1998.

CHEN C.Y. ; BAKER, S. C. ; DARTON; R. C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources .*Journal of Microbiological Methods*,v. 70, p.503 – 510, 2007.

CLASSEN, A.T.; BOYLE,S.I.; HASKINS, K.E.; OVERBY, S.T.; HART, S.C. Community level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology Ecology*, v.44(3), p. 319-328, 2003.

COOPER, D.G.; AKIT, J.; KOSARIC, N. Surface activity of the cells and extracellular lipids of *Corynebacterium fascines* CF 15. *Journal of Fermentation Technology*, v. 60, p. 19-24, 1982.

CRECCHIO, C.; GELSOMINO, A.; AMBROSOLI, R.; MINATI, J.L.; RUGGIERO, P. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36(11), p. 1873-1883, 2004.

COUTINHO, J.O.P.A. Seleção de bactérias com o potencial de de-emulsificação de efluentes industriais emulsionados. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

DAS, M. Characterization of de-emulsification capabilities of *Micrococcus* species. *Bioresource Technology*, v. 79, p. 15-22, 2001.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, v.98 (7), p. 1339–1345, 2007.

DELCOLLE, Roberta. Desemulsificação de emulsões estáveis de água e óleo de girassol por processo de filtração tangencial. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de

São Paulo, São Carlos, 2005. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18135/tde-21022006-131152/>>.
Acesso em: 2012-02-01.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47–64, 1997.

DiGIOVANNI, G.; WIDMAR, F.; SEIDLER, R.J.; WATRUD, L.S. Molecular analysis of diversity represented by a metabolic culture assay of a soil microbial community. In: general meeting of the American Society for Microbiology, 97, Miami Beach., 1997.

DOBRANIC, J.K.; ZAK, J.C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Mycologia*, v. 91, p. 756-765, 1999.

DUVNJAK, Z.; KOSARIC, N. Deemulsification of petroleum w/o emulsions by selected bacterial and yeast cells. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 39-42, 1987.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I.M. Applications of Biological Surface Active Compounds in Remediation Technologies. *Biosurfactants*, edited by Ramkrishna Sen, 2008, Landes Bioscience.

GALLEGO, J.L.R; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁSQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, v. 12, p. 325–335, 2001.

GRAY, N.C.C; KOSARIC, N.; STEWART, A.L.; CAIRNS, W.L. Bacteria induced de-emulsification of oil in water petroleum emulsions. *Biotechnology Letters*, v. 6, p. 419-424, 1984.

GANDHIMATHI. R.; KIRAN.G.S; HEMA.T.A; SELVIN.J.; RAVIJI.T.R; SHANMUGHAPRIYA.S. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA 10. *Bioprocess Biosystems Engeneering*, v. 32, p. 825-835, 2009.

GARLAND, J.L. Patterns of potencial C source utilization by rizosphere communities. *Soil Biology and Biochemistry*, v.28, p.223-230, 1996.

GIORDANO, G. Tratamento e controle de efluentes industriais . 2004

GOMEZ, E.; GARLAND, J.; CONTI, M. Reproducibility in the response of soil

bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology*, v. 26, p.21-30, 2004.

HAACK, S.K.; GARCHOW, H; KLUG, M.J.; FORNEY, L.J. Analysis of Factors Affecting the accuracy, Reproducibility, and interpretation of Microbial Community Carbon Source utilization Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1458-1468, 1995.

HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB4004 from waste frying oil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 379–387, 2000.

HAMAMURA, N.; OLSON, S.H.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6316–6324, 2006.

HAMME, J.D.V; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 604-620, 2006.

HUANG, X. F.; LIU, J.; LU, L. J.; WEN, Y.; XU, J. C.; YANG, D. H.; ZHOU, Q. Evaluation of screening methods for demulsify bacteria and characterization of lipopeptide bio-emulsifer produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1358–1365, 2009.

HUANG, X.F.; GUAN, W.; LIU, J.; LU, L.J.; XU, J.C.; ZHOU, Q. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 317-323, 2010.

HUANG, X. F.; LIU, J.; LU, L. J.; WEN, Y.; XU, J. C.; YANG, D. H.; ZHOU, Q. Evaluation of screening methods for demulsify bacteria and characterization of lipopeptide bio-emulsifer produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1358–1365, 2009.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. *Mycopathologia*, v. 75, p. 149-158, 1981.

JANIYANI, K. L.; PUROHIT, H. J.; SHANKER, R.; KHANNA, P. De-emulsification of oil-in-water emulsions by *Bacillus subtilis*. *World Journal Microbiology*, v. 10, p. 452-456, 1994.

JEON, B.Y, JUNG, I.L.,PARK, D. H. Mineralization of Petroleum Contaminated Wastewater by Co-Culture of Petroleum-Degrading Bacterial Community and Biosurfactant-Producing Bacterium. *Journal of Environmental Protection*,v. 2, p. 895-902, 2011.

JØRGENSEN, K.S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.-M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, v. 107, p. 245-254, 2000.

JUHASZ, A. Microbial degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. Doctor theses. Victoria University of Technology, 1998.

KODRES, C. A. Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile.

Environ. Model. Softw., Oxford, v.9, p.37-47, 1999.

KOSARIC, N.; GRAY, C.C.; STEWART A. L.; CAIRNS W. L. Bacteria induced de-emulsification of complex petroleum emulsions. *Biochemical Engineering Research Reports*, v. VII, part II, University of Western Ontario, London, Canada, 1982.

KNIEMEYER, O.; PROBIAN, C.; ROSSELLO-MORA, R.; HARDER, J. Anaerobic Mineralization of Quaternary Carbon Atoms: Isolation of Denitrifying Bacteria on Dimethylmalonate. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3319–3324, 1999.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Microbial deemulsifiers, p. 247-320 *In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Ed.) Biosurfactants and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1987.

KRONEMBERGER, F.A. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. Tese (Engenharia Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

Oh, Y.K.; SEOL, E.H.; KIM, J.R.; PARK, S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 28, p. 1353 – 1359, 2003

LAHA, S.; TANSEL, B.; USSAWARUJIKULCHAI, A. Surfactant-soil interactions during surfactant amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. *Journal of Environmental Management*, v.90, p. 95-100, 2009.

LEUNISSEN, M.E.; VAN BLAADEREN, A.; HOLLINGSWORTH, A.D.; SULLIVAN, M.T.; CHAIKIN, P.M. Electrostatics at the oil–water interface, stability, and order in emulsions and colloids. *P.N.A.S.*, v.104, p. 2585-2590, 2007.
LI, X.; LI, A.; LIU, C.; YANG, J.; MA, F.; HOU, N.; XU, Y.; REN, N. Characterization

of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition. *Process Biochemistry*, v.47(4), p.626-634, 2012.

LIMA, T. M. DA S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. Universidade Federal de Viçosa, 2008.

LIU, J.; HUANG, X.F.; LU, L.J.; LI, M.X.; XU, J.C.; DENG, H.P. Turbiscan Lab® Expert analysis of the biological demulsification of water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers. *Journal of Hazardous Materials*, v. 190, p. 214-221, 2011.

LIU, J.; HUANG, X.F.; LU, L.J.; XU, J.C.; WEN, Y.; YANG, D.H.; ZHOU, Q. Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp. S-JS-1. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6481-6487, 2009.

LIU, J.; HUANG, X.F.; LU, L.J.; XU, J.C.; WEN, Y.; YANG, D.H.; ZHOU, Q. Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion. *Journal of Hazardous Materials*, v. 183, p. 466-473, 2010.

LY, M.N.; BOUCHEZ, M.N.; MEYLHEUE, T.; FONTAINE, M.N.B.; LE, T.M.; BERLIN, J.N.; WACHÉ, Y. Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p. 26-34, 2006.

LORS, C.; RYNGAERT, A.; PÉRIÉ, F.; DIELS, L.; DAMIDOT, D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, v.81, p.1263-1271, 2010.

MANNING, F.S.; THOMPSON, R.E. Oilfield processing. *Penn Well Publishing Company*. University of Tulsa. Tulsa, Oklahoma, 1995.

MARTIN, N.A., *Princípios de Físico-Química Para Farmácia Y Biología*, Madrid: Ed. Alhambra, 579-610, 647-658, 1967.

MILLER, R.M & BARTHA, R. Evidence from Liposome Encapsulation for Transport-Limited Microbial Metabolism of Solid Alkanes. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 55, p. 269-274, 1989.

MOLINA, M.C; GONZÁLEZ, N.; BAUTISTA, L.F.; SANZ, R.; SIMARRO, R.; SÁNCHEZ, I.; SANZ, J.L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, v. 20, p.789–800, 2009.

MORAES, E.B. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas. Dissertação de Mestrado (Microbiologia). Universidade Estadual Paulista, 2005.

MORITA, T.; MASAOKI, K.; FUKUOKA, T.; IMURA, T; KITAMOTO, D. Physiologi-

cal differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 74, p. 307-315, 2007.

MULLIGAN, C.N .Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-189, 2005.

NABI, N.; AIMAR, P.; E MEIRELHES, M. Ultrafiltration of olive oil emulsion stabilized by anionic surfactant. *Journal of Membrane Science*, v. 166, p. 177-188, 2000.

NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. De-emulsification of petroleum oil emulsion by mixed bacterial culture. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1135-1141, 2001.

NADARAJAH, N.; SINGH A.; WARD, O. Evaluation of mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 435-440, 2002.

NEU, T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, v. 60, p. 151-166, 1996.

NEUFELD, R.J.; ZAJIC, J.E. A technique for monitoring biomass levels and cell adhesion in hexadecane fermentations. *Biomedical and Life Sciences*, v.4, p. 701-704, 1982.

NEVES, C.H. Estudo do processo produtivo de poliestireno usando água como agente de expansão física. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

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

PALLA, B.J.; SHAH, D.O. Stabilization of high ionic strength slurries using surfactant mixtures: Molecular Factors that determine optimal stability. *Journal of Colloid and interface science*, v. 256, p. 143-152, 2002.

PAULA, A.M. Atributos microbiológicos do solo em área de pastagem irrigadas com lâminas excedentes de efluente de esgoto tratado. Tese de doutorado (Agronomia). Universidade de São Paulo, 2008.

PERESSUTTI, S.R.; ALVAREZ,H.M.; PUCCI, O.H. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil . *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 52, p. 21 – 30, 2003.

PINHO, J.R.G, STORPIRTIS, S., (1998). Formação e Estabilidade Física das Emulsões. *Cosmetics & Toiletries* (Edição em Português), Vol. 10, nov/dez, p. 44-56.

PINZON, N.M.; JU, L.K. Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnol Lett*, v. 31, p. 1583-1588, 2009.

PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. M. R, Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica, 4a Ed. Porto, Fundação Calouste Gulbenkian, 1:147-171, 959-1008, 1992.

PRESTON-MAFHAM, BODDY, L.; RANDERSON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles- a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, v.42(1), p. 1-14, 2002.

PYOUNG II, K.; RYU, J.; KIM, Y.H.; CHI, Y-T. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.20, p. 138-145, 2010.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v. 3(4), p. 229-236, 2001.

ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena, Surfactants Research Institute, Brookling College, The City Universe of New York, 3rd edition, 2004.

ROSEMBERG, M.; Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: water interface. *Critical Reviews in Microbiology*, v.18, p.159-173, 1991.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROS, 2010 Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitranthydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6916-6923, 2010.

RUGERRI, C.; FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; SERGI, S.; TAMBURINI, E. Isolation and characterization of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *International biodeterioration and biodegradation*, vol. 63, P. 936-942, 2009.

SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M.N. An investigation for potencial development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, v. 3(5), p. 111-117, 2009.

SHAW, D.J. Introduction to colloid and surface chemistry. Oxford: Reed Education and Professional Publishing Ltd, p. 306, 1992.

SAYAVEDRA-SOTO, L.A.; HAMAMURA, N.; LIU, C-H; KIMBREL, J.A.; CHANG, ARP, D.J.; The membrane-associated monooxygenase in the butane-oxidizing Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain CF8 is a novel member of the AMO/PMO family

. *Environmental Microbiology Reports* v.3, p. 390–396, 2011.

SATOW, M.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; HOOG, G.S.; ANGELIS, D.F; VICENTE, V.A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Studies in Microbiology*, v. 61, p. 157-163, 2008.

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30(2), p. 127-144, 2010.

SCHOEFS, O.; DESCHENES, L.; SAMSON, R. Efficiency of a new covering system for the environmental control of biopiles used for the treatment of contaminated soils. *Journal of Soil Contamination*, v.7(6), p.753-771, 1998.

SEABRA, Paulo Negrais Carneiro. Aplicação de biopilha na remediação de solos argilosos contaminados com petróleo. Tese (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

SHAVANDI, M.; MOHEBALI, G.; HADDADI, A.; SHAKARAMI, H.; NUHI, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 82, p.477-482, 2011.

SHAW, D.J. Introduction to colloid and surface chemistry. Oxford: Reed Education and Professional Publishing Ltd, p. 306, 1992.

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology. Techniques*, vol. 5, p. 265-268, 1991.

SILVA, R.C.R. Alterações da mobilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via *core-flow*. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SILVA, L.J. Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos .Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009.

SILVA, J.C. Desenvolvimento de processo integrado utilizando processos de separação por membrana e adsorção em carvão ativado para o tratamento de água associada à produção de petróleo . Dissertação de Mestrado (Engenharia Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SINGH, A.; HAMME J. D.V.; WARD O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Applications aspects: a review. *Biotechnonology Advances*, v. 25, p. 99-121, 2007.

SMITH, C. D.; FURCOLOW, M. L. Efficiency of three techniques for isolating *Histoplasma capsulatum* from soil including a new flotation technique. *Journal of Laboratorial Clinical Medecine*, v. 64, p. 342-348, 1964.

SOUZA, M.A. Deemulsificação e purificação de resíduos gordurosos provenientes de esgotos domésticos. Dissertação (Mestrado), Universidade Regional de Blumenau, 2003.

SWISHER, R.D. Surfactant biodegradation, Marcel Dekker Inc., 2th edition, New York, p 17- 31, 1987.

THAVASI, R.; SUBRAMANYAM NAMBARU, V. R. M.; JAYALASKSHMI,S.; BALASUBRAMANIAN,T.; BANAT , I.M. Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. *Marine Biotechnology*, v.11(5), p.551-556,2009.

TOLEDO. F.L; CALVO. C.; RODELAS. B.; GONZÁLEZ-LOPEZ. J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, v.29 (3), p.244-252, 2006.

UENO, A.; ITO, Y.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 23, p. 1739-1745, 2007.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concenpts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Madame Curie Bioscience Database*, v.672, p. 1-13, 2010.

WEN, Y.; CHENG, H.; LU, L.J.; LIU, J.; FENG, Y.; GUAN, W.; ZHOU, Q.; HUANG, X.F. Analysis of biological demulsification process of water-in-oil emulsion by *Alcaligenes* sp. S-XJ-1. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8315-8322, 2010.

WRENN, B.; VENOSA, A.D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most probable number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 252-258, 1996.

WU, J.Y., YEH, K.L., LU, W.B., LIN, C.L. ; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*,v. 99, p. 1157-1164, 2008.

XIA, W.J.; DONG, H.P.; YU, L; YU, D.F. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v.56, p. 339-347, 2004.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional

diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and*

Biochemistry, v.26, p.1101–1108, 1994.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOOREHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29(2), p. 111-119, 1999.