



UNILASALLE
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE



CRISTINA FERNANDES GARBINO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES
DE BIOSURFACTANTES PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE CÁTIONS
METÁLICOS.**

CANOAS, 2013

CRISTINA FERNANDES GARBINO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES
DE BIOSSURFACTANTES PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE CÁTIOS
METÁLICOS.**

Dissertação apresentada à banca de examinadora do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Avaliação de Impactos Ambientais.

Orientação do Prof. Dr. Delmar Bizani.

CANOAS, 2013

CRISTINA FERNANDES GARBINO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES
DE BIOSURFACTANTES PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE CÁTIOS
METÁLICOS.**

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Avaliação
de Impactos Ambientais do Centro Universitário
La Salle – UNILASALLE. :

Aprovado pela banca examinadora em 06 de setembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Marqueze
UNILASALLE

Prof^a. Dr^a. Gelsa Edith Navarro Hidalgo
UFRGS

Prof.Dr. Rubens Müller Kautzmann.
UNILASALLE

Ao meu e filho Diego pela paciência e amor que me dedica. Amo você!

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Delmar Bizani, pela oportunidade de participar do seu Projeto, amigo dedicado, símbolo de sabedoria, por ajudar na realização deste trabalho, ajudando a superar as minhas dificuldades. A você, toda a minha admiração!

À Prof^a. Dr^a. Alessandra Marqueze, pela generosa indicação. Sem você, sem a sua ajuda, eu não teria tido esta oportunidade.

À amiga Vanessa Matte, por compartilhar o mesmo sonho e juntas novamente superamos as dificuldades.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Vale pela oportunidade e apoio financeiro e aos colaboradores: UNILASSALE, COPELMI Ltda e UFRGS.

Aos colegas de Laboratório de Microbiologia, Matheus S. Spagiari, Priscylla A. Volkart, Debora C. R. J. Ávila, Milena B. Peck e Luciele R. Monzon, pelo apoio e paciência durante a execução desta pesquisa.

À banca examinadora pelas correções e sugestões que muito contribuíram a este trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

Este trabalho objetivou isolar bactérias com propriedades produtoras de substâncias surfactantes, a partir de solos contaminados com metais pesados e/ou derivados de petróleo, além de testar os biosurfactantes semipurificados quanto o seu potencial uso em processo de biorremediação de cátions metálicos. Os microrganismos foram isolados através da técnica de diluições seriadas, de amostras de solo provenientes de oficinas mecânicas, ferros-velhos, postos de combustíveis e lavagem de automóveis. Cada isolado foi estimulado em meio de cultivo com o objetivo de verificar o Índice de Emulsificação (IE). Foram selecionadas dez das linhagens bacterianas com o maior IE. As linhagens foram mantidas, cultivadas, centrifugadas onde o precipitado foi extraído quimicamente, obtendo assim o Biosurfactante semipurificado (BSP). Cada BSP foi submetido à determinação Unidade Arbitrária (UA_E/ml) e estabilidade iônica com concentrações de 5, 10 e 20% (m/v), resistências às variações de pHs (2, 6 e 9) e estabilidade térmica com temperaturas de 80, 100 e 120°C. A Concentração Micelar Crítica (CMC) foi determinada pelo método tensiométrico e confirmado pelo método da espectrometria de absorção visível. Na avaliação da capacidade de complexação de cátions metálicos, os BSP foram adicionados em soluções contendo, separadamente, Cr, Mn e Ni (30ppm), posteriormente centrifugado e o líquido analisado, com finalidade de verificar a capacidade de remoção dos cátions metálicos. Das 106 linhagens de bactérias de solos contaminados, 101 produziram surfactantes e dessas 77 se mantiveram emulsificadas por mais de sete dias. A média de emulsificação das 77 bactérias em T₀, T₂₄, TS₇ foram de 49,05%, 45,03% e 43%, respectivamente. As dez linhagens selecionadas apresentaram um IE% ≥ 50% onde a maioria foi identificada como sendo: *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas cepacea*, *Serratia odorifera*, *Xanthomonas maltophilia*, *Staphylococcus* spp. Os valores das UA do BSP variaram entre 160 a 1280 UA_E/mL. Os BSP apresentaram 100% de emulsificação mesmo após serem submetidos a uma concentração de NaCl à 20% (m/v). Também mantiveram emulsificação em todas as faixas de pH e temperaturas testadas. Na determinação da CMC, os dez BSP variaram de 4,9 mg/mL a 32,3 mg/mL. Os BSP com menor valor de CMC foram utilizados para dar sequência aos testes de remoção dos cátions metálicos, os quais apresentaram os seguintes resultados: BSP8 = 99,3% de remoção de Mn; BSP9 = 99,2% de remoção de Ni e BSP8 =

99,4% de remoção de Cr. Os resultados demonstram que os microrganismos existentes em solos contaminados podem apresentar uma potencial capacidade biorremediadora, complexando cátions metálicos. Assim, estes dados podem ser utilizados, com vantagens em diversos ramos industriais e na biorremediação das áreas contaminadas.

Palavras-chave: Biossurfactantes. Linhagens bacterianas. Biorremediação. Cátions metálicos.

ABSTRACT

This work aimed to isolate bacteria with surfactant properties producing substances from soils contaminated with heavy metals and/or petroleum products, besides testing the semi-purified biosurfactants as their potential use in bioremediation of metal cations. The microorganisms were isolated using the technique of serial dilutions of soil samples from mechanics workshop, junkyards, gas stations and car wash. Each isolate was stimulated in culture medium in order to check the emulsification index (IE). We selected ten of bacterial strains with the highest IE. The strains were maintained, grown, where the centrifuged precipitate was extracted chemically, so getting the semi-purified biosurfactant (SPB). Each BSP was subjected to the determination and arbitrary unit (AU E/ml) stability and ionic concentrations of 5, 10 and 20% (w/v), pH variations resistors (2, 6 and 9) and thermal stability at temperatures of 80, 100 and 120° C. The Critical Micelle Concentration (CMC) was determined by the tensiometric method and confirmed by visible absorption spectrometry. In assessing the ability of complexing metal cations, BSP-containing solutions were added separately, Cr, Mn, and Ni (30ppm), and subsequently centrifuged and the liquid analyzed in order to verify the ability of removing metal cations. 106 strains of bacteria contaminated soil which produced 101 of these surfactants and 77 remained emulsified more than 7 days. The average of 77 bacteria emulsification at T0, T24, TS7 were 49.05%, 45.03% and 43%, respectively. The ten selected strains showed an IE $\geq 50\%$ where the majority was identified as *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia odorifera*, *Xanthomonas maltophilia*, *Staphylococcus* spp. The values of the AU BSP ranged from 160-1280 AU E/mL. The BSP emulsification showed 100% even after being subjected to a NaCl concentration of 20% (w/v). Also maintained in all the emulsification pH ranges and temperatures. In determining the CMC, the ten-ram BSP varies from 4.9 - 32.3 mg/mL. The BSP less amount of CMC were used to give the following tests removal of metal cations, which showed the following results: BSP8 = 99.3% removal of Mn; BSP9 = 99.2% removal of Ni and BSP8 = 99.4% removal of Cr. The results demonstrate that the microorganisms existing in contaminated soils may bioremediation potential capacity through metal cations complexation. Thus, these data can be used with advantages in different industrial and bioremediation of contaminated areas.

Keywords: Biosurfactants. Bacteria strains. Bioremediation. Metal cations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem ilustrativa da ação dos biossurfactantes sobre contaminante.	22
Figura 2 - Tipos de agregados formados por biossurfactante.	25
Figura 3 - Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo. ...	29
Figura 4 - Princípio do mecanismo de atividade do biossurfactante em solo contaminado por metais.	32
Figura 5 - Profundidade e modo de coleta de amostra de solo.	38
Figura.6 - Esquema do processamento da amostra em laboratório.	39
Figura 7 - Exemplo do cálculo de Unidades Arbitrária de Emulsificação (UA _E /ml)...	42
Figura 8 - Visualização do teste do índice de emulsificação dos sobrenadantes das culturas bacterianas.	49
Figura 9 - Total de linhagens bacterianas isoladas com capacidade produtora de biossurfactante.	50
Figura 10 - Valores do Índice de emulsificação das 77 linhagens bacterianas e sua estabilidade em diferentes tempos.	51
Figura 11 - Visualização microscópica micelar da ação emulsificante do biossurfactante (A) L4F6 e (B) L1L11. Ampliação 400x.	52
Figura 12 - Medidas de absorvância para diferentes concentrações de BSP utilizando o corante sudan III (504nm).	61
Figura 13 - Eficiência de remoção dos metais em solução, após aplicação dos BSP.	64

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Processos tecnológicos aplicados como estratégias de biorremediação de solos e suas fundamentações.	20
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da técnica de biorremediação, de acordo com os itens mais relevantes.	21
Tabela 3 - Lista dos principais microrganismos participantes do processo de biorremediação, com possível uso em escala industrial, segundo os tipos de contaminantes.	23
Tabela 4 - Principais classes de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.	27
Tabela 5 - Principais fontes antrópicas de metais tóxicos e elementos relacionados.	31
Tabela 6 - Mecanismo de atuação de biossurfactantes e suas aplicações industriais.	34
Tabela 7 - Designação e estratificação das amostras de solo, segundo os locais de coleta, realizadas em diferentes pontos da cidade de Canoas e o número de linhagens isoladas de cada local.	47
Tabela 8 - Locais contaminados e seus contaminantes.	48
Tabela 9 - Linhagens bacterianas escolhidas segundo os critérios de índice de Emulsificação e estabilidade.	52
Tabela 10 - Identificação das linhagens bacterianas segundo suas designações amostrais.	54
Tabela 11 - Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA μ /ml) de cada bactéria.	55
Tabela 12 - Efeito da força iônica sobre emulsificação do BSP nas concentrações de 5%, 10% e 20% (m/v) de NaCl.	56
Tabela 13 - Efeito da mudança de faixa de pH sobre emulsificação do BSP.	57
Tabela 14 - Efeito do tempo de exposição do BSP em diferentes temperaturas e tempos.	58
Tabela 15 - Valores do CMC determinados pelo método tensiométrico dos BSP em solução aquosa e solução tampão	60
Tabela 16 - Valores de CMC determinados pelo método espectrométrico dos BSP em solução aquosa de corante sudan III.	61

Tabela 17 - Identificação das linhagens bacterianas dos BSP utilizados na remoção de cátions metálicos com suas respectivas unidades arbitrária.	62
Tabela 18 - Média e desvio padrão das concentrações de cátions metálicos não removidos após aplicação dos BSP.	62
Tabela 19 - Valores percentuais e absolutos do efeito complexante dos BSP testados.	62

LISTA DE SIGLAS

AN	Ágar nutriente
BHI	Brain Heart Infusion
BSP	Biossurfactante semipurificado
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Níquel II
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sulfato Mono-hidratado de manganês II
CMC	Concentração Micelar Crítica
Cd	Cádmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Fe	Ferro
g/L	Gramas por litro
g/mL	Gramas por mililitro
He	Altura da Emulsão
Ht	Altura Total
HCl	Ácido clorídrico
IE	Índice de Emulsificação
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Dicromato de potássio (Cr VI)
LF	Ferro velho
LL	Posto de Lavagem de combustível
LM	Oficina Mecânica
LP	Posto de combustível
Pb	Chumbo
PBS	Phosphate Buffer solution (Tampão Fosfato Salino)
pH	Potencial Hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
Meio SIM	Meio sulfito, indol e motilidade
Mg	Magnésio
mg/mL	Miligramas por mililitros
Milli-q	Água deionizada com condutividade maior de $18,2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$
Mn	Manganês
mN/m	Milnewton/metro
mmol/L	Milimol por litro

m/v	Massa/volume
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ppm	Partes por milhão
REFAP	Refinaria Alberto Pasqualini
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T ₀	Repouso de dois minutos
T ₂₄	Repouso de 24hs
TS ₇	Repouso de 7 dias
TS	Tensão Superficial
TI	Tensão Interfacial
TSI	Meio Ágar ferro tríplice açúcar
UA _E /ml	Unidade Arbitrárias de emulsificação por mL
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
2.1 Biorremediação	19
2.2 Tipos de biorremediação	20
2.3 Microrganismos biorremediadores	22
2.4 Biossurfactantes	24
2.5 Classificação e natureza química dos Biossurfactantes	25
2.6 Eficiência dos biossurfactantes	28
2.7 Biorremediação de metais pesados	30
2.8 Áreas de aplicação	33
3 OBJETIVO GERAL	35
3.1 Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Meios De Cultura	36
4.1.1 Caldo e Ágar Nutriente	36
4.1.2 Caldo BHI	36
4.1.3 Água Peptonada a 0,1%	36
4.1.4 PBS	36
4.2 Esterilização	37
4.3 Coletas	37
4.3.1 Locais das coletas	37
4.3.2 Técnica de coleta de solo	37
4.3.3 Identificação e descrição dos locais de coleta	38
4.4 Isolamento e manutenção dos microrganismos	39
4.5 Seleção de linhagem produtoras e Índice de Emulsificação (IE%)	40
4.6 Produção de Biossurfactante	40
4.7 Identificação das bactérias	41
4.8 Determinação das Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA E/ml)	41
4.9 Determinação do efeito do NaCl, Temperatura e pH na atividade biossurfactante	42
4.9.1 Estabilidade frente à força iônica:	42
4.9.2 Estabilidade frente ao pH	42

4.9.3 Estudo de estabilidade térmica	43
4.10 Determinações da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	43
4.10.1 Determinação CMC pelo método tensiométrico	43
4.10.2 Determinação CMC por espectrometria de absorção UV-Vis	44
4.11 Avaliação da Capacidade de remoção de metais.....	44
4.11.1 Seleção de bactérias produtoras de biossurfactante.....	44
4.11.2 Preparo das soluções de Níquel, Manganês e Cromo.	44
4.11.3 Remoção de cátions (Ni, Mn e Cr).	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Determinação do Índice de Emulsificação (IE).....	48
5.2 Identificação das linhagens bacterianas.....	53
5.3 Determinação de Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA_E/ml).....	54
5.4 Determinação do efeito do NaCl, Temperatura e pH na atividade biossurfactante.....	55
5.4.1 Estabilidade frente à força iônica	55
5.4.2 Estabilidade frente ao pH	56
5.4.3 Estudo de estabilidade térmica	57
5.5 Resultado dos testes de avaliação da determinação da CMC	58
5.6 Remoção de cátions metálicos (Ni, Mn e Cr).....	61
5.7 Aplicações	64
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICE A - Índice de Emulsificação (IE) das 106 linhagens isoladas.....	77
APÊNDICE B - Resultados das provas bioquímicas usadas na identificação das bactérias selecionadas.....	79
ANEXO A - Relatório do laboratório ALAC – Amostra BSP 2	80
ANEXO B - Relatório do laboratório ALAC – Amostra BSP 3	81
ANEXO C - Relatório do laboratório ALAC – Amostra BSP 4.....	82

1 INTRODUÇÃO

A atividade antrópica vem provocando profundas mudanças nos ecossistemas terrestres. Com o crescente desenvolvimento tecnológico e industrial são liberados resíduos industriais trazendo consequências negativas ao meio ambiente. Os frequentes acidentes ambientais causam a destruição da natureza comprometendo a existência das futuras gerações e a qualidade de vida no mundo atual.

As principais contaminações ambientais estão associadas às diferentes atividades antropogênicas, entre os quais se incluem às agroindústrias, à produção de carvão vegetal, à extração e gaseificação do carvão mineral, indústrias petroquímicas com toda sua cadeia de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Portanto, a necessidade de recuperar ou remediar os ambientes contaminados favorece o estudo e desenvolvimento de diferentes tecnologias para recuperação ambiental. O uso de biossurfactantes parece desempenhar um papel importante na biorremediação dos ambientes impactados, pois possibilitam a emulsão e aumento da solubilidade dos compostos hidrofóbicos, disponibilizando-os para a biodegradação e promovendo a aceleração do processo.

A biorremediação é um processo no qual o organismo vivo, normalmente, plantas ou microrganismos, são utilizados tecnologicamente para remediar poluentes no ambiente. A utilização de microrganismos com propriedades surfactantes, conhecidos como biossurfactantes, aceleram a degradação e agregação de várias substâncias como óleos, metais e compostos químicos. Surfactantes são moléculas anfipáticas, que podem ser obtidas por processos químicos (sintéticos), ou biológicos (produzidos por microrganismos) (MULLIGAN et al., 2001).

Os biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por microrganismos em condições específicas de crescimento, ou seja, algumas linhagens microbianas só o produzem diante de certos compostos, os quais são exigidos como principais fontes de carbono. Aqueles apresentam propriedades e características similares aos surfactantes quimicamente sintetizados. Devido sua natureza anfipática, estas moléculas, tanto biológicas como sintéticas, são capazes de reduzir as tensões superficiais de sistemas água/ar e água/óleo. Podem

apresentar propriedade como aumento da adsorção de moléculas; formação de micelas e de macro e microemulsões; aumento da dispersão ou agregação de sólidos; ação espumante; aumento da solubilidade e da mobilidade.

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas. Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (REISER et al., 1989). Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os custos do petróleo aumentam.

Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em solos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes, entretanto, os estudos ainda ocorrem a nível laboratorial e a biorremediação de solos utilizando biossurfactantes permanece ainda como um desafio a ser enfrentado.

Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi isolar e selecionar linhagens bacterianas, provenientes de locais contaminados, com potencial de produzir substâncias surfactantes e possibilidade de uso em técnicas de biorremediação de metais.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Neste capítulo serão revisados os aspectos mais relevantes sobre a geração de problemas ambientais, as consequências sobre os ecossistemas e as possibilidades de uso alternativo de metodologias com capacidades minimizadoras dos compostos ecotóxicos. Serão discutidas as técnicas convencionais e técnicas emergentes para a biorremediação em diferentes ambientes. Comentar-se-á os aspectos biológicos de biorremediação, incluindo uma revisão sobre microrganismos com capacidade biossurfactante e sua aplicação como atenuantes naturais de poluentes gerados por sistema extrativista.

2.1 Biorremediação

O termo biorremediação pode ser definido como um processo que utiliza a biotecnologia na aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos (TORSVIK et al., 1990).

Este processo destaca-se como uma opção para promover a destoxificação do local ou a remoção de elementos contaminantes do solo e/ou água. A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (microrganismos e plantas), que possuam a capacidade de remover, reduzir ou modificar determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes ou menos tóxicas (JACQUES et al., 2010). Esta biotecnologia vem sendo utilizada há anos em vários países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Segundo Gaylarde et al., (2005) este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterros e áreas de contenção. Embora outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos sejam também indicadas para descontaminar ambientes poluídos, o processo biológico de biorremediação, é uma alternativa

ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos.

Destacam-se três aspectos principais neste processo: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Já as estratégias de biorremediação incluem: a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (atenuação natural ou intrínseca); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2003).

2.2 Tipos de biorremediação

As técnicas de biorremediação variam entre os tratamentos “in situ” (no local) e “ex situ” (fora do local) que envolvem inúmeros procedimentos, conforme listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Processos tecnológicos aplicados como estratégias de biorremediação de solos e suas fundamentações.

ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO	FUNDAMENTOS
Atenuação natural	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos microrganismos indígenas do solo
Bioestimulação	Adição de nutrientes, como Nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) para estimular os microrganismos nativos.
Bioaugmentação	É a inoculação no local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
Bioventing	É uma forma de bioestimulação por adição de gases estimulantes como O ₂ e CH ₄ , para aumentar a atividade microbiana decompositora.
Landfarming	É a aplicação e incorporação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície de solo não contaminado para degradação.

Fonte: Adaptado de Sharma e Reddy, 2004

Alguns princípios da biorremediação podem ser utilizados em toda sua extensão, visando, como objetivo principal, à otimização do processo de degradação dos poluentes pelos microrganismos. Dentre estes se destacam a bioaugmentação que utiliza a adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras e a bioestimulação que utiliza a adição de nutrientes que aumenta a atividade microbiana nativa. Um dos compostos adicionado são os surfactantes, que auxiliam a metabolização dos elementos poluentes, facilitando o transporte destes substratos orgânicos para o interior das células microbianas ou diminuindo as interações superficiais contaminante/solo. Ainda há a adição de enzimas comerciais, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos (RAIMUNDO; RIZZO, 2004).

Uma das maiores vantagens das técnicas de biorremediação, como mostra a Tabela 2, é a possibilidade de serem executadas no próprio sítio contaminado. Em relação às técnicas convencionais (incineração, aterramento etc.), são normalmente mais econômicas, eliminam permanentemente o risco da contaminação, têm boa aceitação da opinião pública e há um encorajamento das agências reguladoras ambientais com respeito à sua utilização, podendo ser associadas com outros métodos químicos ou físicos de tratamento (SEABRA, 2005).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens da técnica de biorremediação, de acordo com os itens mais relevantes.

VANTAGEM	DESVANTAGEM
Processo natural	Limitado aos compostos biodegradáveis
Microrganismos capazes de degradar o contaminante aumentam quando o contaminante está presente, diminuindo depois.	Existe a preocupação que os produtos da biodegradação possam ser mais resistentes ou tóxicos que os produtos originais
Resíduos dos tratamentos geralmente inócuos (dióxido de carbono, água e biomassa microbiana)	Os contaminantes podem ser líquidos sólidos e gases
Teoricamente útil para a destruição completa de uma vasta gama de contaminantes	É difícil fazer a extrapolação de estudos de laboratório para operações em larga escala
Muitos contaminantes considerados perigosos podem ser transformados em produtos inofensivos	É necessária investigação para desenvolver tecnologias de biorremediação que permitam tratar locais com misturas complexas de contaminantes
É possível a destruição completa dos contaminantes, em vez de transferi-los de local. Pode ser levada a cabo do próprio local.	Os processos biológicos são geralmente específicos; é necessária uma população microbiana metabolicamente capaz, condições ambientais favoráveis e níveis apropriados de nutrientes e contaminantes.
Menos cara que outras tecnologias	

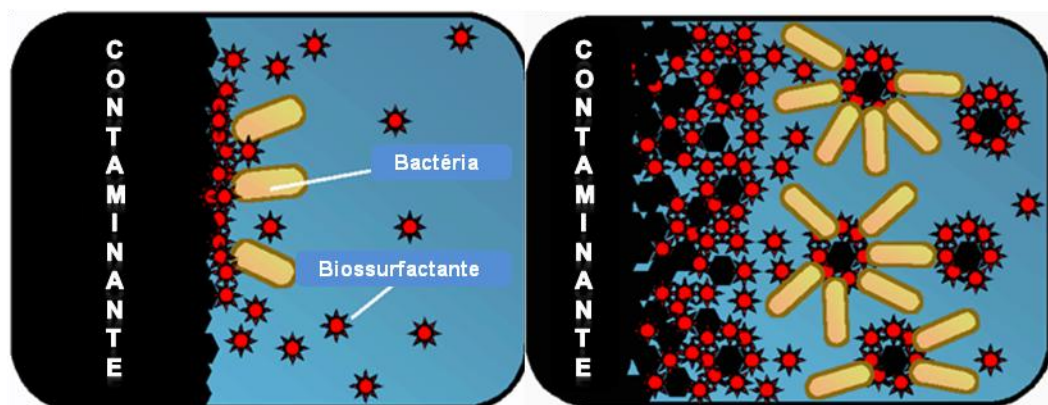
Fonte: Adaptado de ("Biorremediação - na senda da sustentabilidade", 2013).

2.3 Microrganismos biorremediadores

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (SCHIMEL, 1998). Os autores como Cardoso et al., (2003) ressaltam que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura, é derivada de descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos.

Vários são os microrganismos responsáveis por diminuir a toxicidade dos contaminantes no ambiente, tais como: bactérias, fungos e leveduras, que produzem, quando estimulados, substâncias que agem como detergente natural (KREPSKY et al., 2006). Muitos contaminantes têm caráter apolar, o que muitas vezes não é compatível com sítios de entrada e transportadores de membrana celular, indisponibilizando-o, desta maneira, para o metabolismo intracelular. Muitos microrganismos crescem na presença de contaminantes produzindo compostos que aprisionam essas moléculas (VIRAMONTES-RAMOS et al., 2010). Gaylarde et al., (2005) afirma que alguns microrganismos contornam este obstáculo produzindo surfactante e possibilitando, assim, a entrada da molécula apolares para o interior da célula (Figura 1).

Figura 1 - Imagem ilustrativa da ação dos biossurfactantes sobre contaminante.



Fonte: Adaptado de <http://www.natureswaygreen.com/bioremediation.htm>.

Segundo Gaylarde (2005) estes microrganismos têm mostrado um sistema metabólico apto para biodegradar moléculas xenobióticas (substância sintética que

polui o meio ambiente), nos processos de biorremediação, desempenhando a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos e, representando, portanto, o suporte de manutenção da vida da Terra. Esta extraordinária diversidade metabólica se deve a combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbianas em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos (KURTBÖKE; SWINGS, 2004).

Segundo Ron e Rosenberg (2002) os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possui alta capacidade emulsificante, denominados biosurfactantes, consistem em subprodutos metabólicos de microrganismos, que atuam sobre os contaminantes (combustíveis, solventes, metais etc.). Na Tabela 3 são apresentados alguns microrganismos comumente participantes do processo de remediação e os principais tipos de contaminantes.

Tabela 3 - Lista dos principais microrganismos participantes do processo de biorremediação, com possível uso em escala industrial, segundo os tipos de contaminantes.

TIPO DE CONTAMINANTE	MICROORGANISMOS
Petróleo	<i>Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Penicillium, Cunninghamella</i>
Anéis aromáticos	<i>Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Arthrobacter, Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Phanerocheate</i>
Cádmio	<i>Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella, Rhodococcus, Micrococcus luteus</i>
Enxofre	<i>Thiobacillus</i>
Prata, Cobre, Cromo , Chumbo	<i>Streptomyces noursei</i>
Ouro, Cobre, Ferro, Manganês, Níquel	<i>Bacillus subtilis</i>
Cromo	<i>Alcaligenes, Pseudomonas</i>
Cobre	<i>Escherichia coli, Pseudomonas</i>

Fonte: Adaptado de Abbas, 2003.

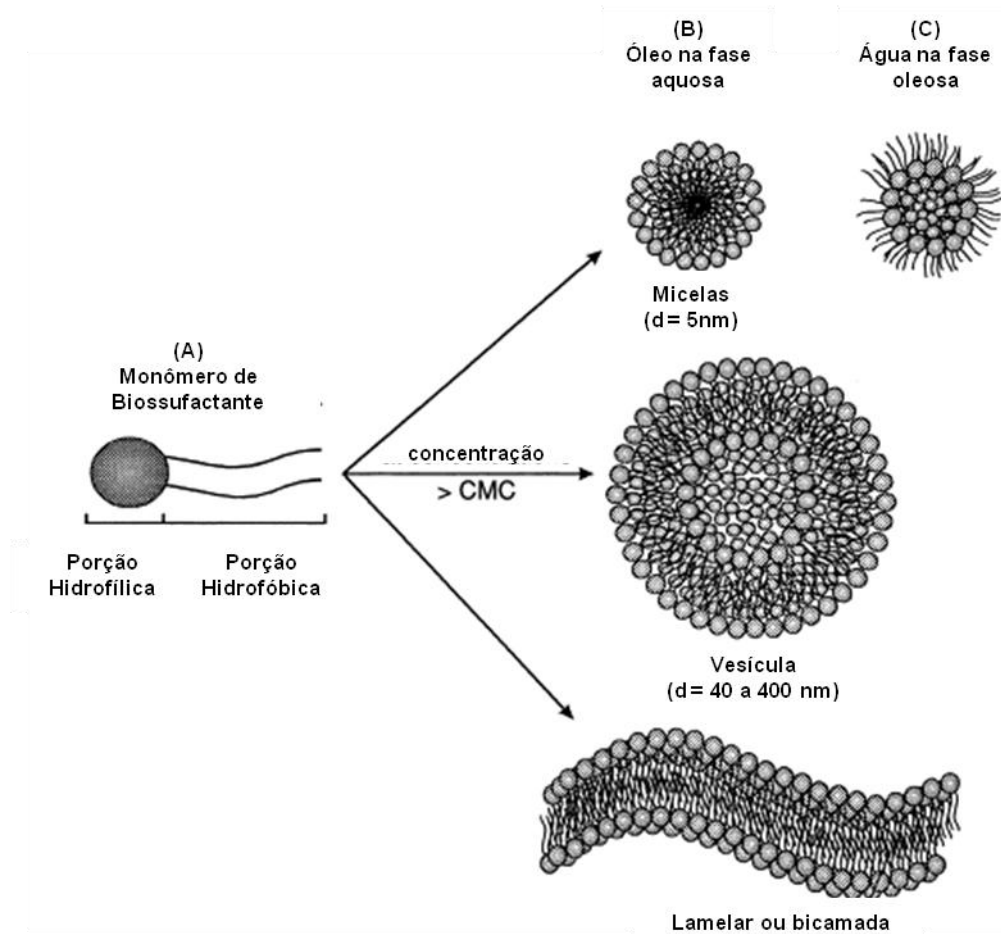
2.4 Biossurfactantes

Os surfactantes estão inseridos numa classe importante de compostos químicos, amplamente utilizados em diversos setores industriais, onde a maioria disponível comercialmente é sintetizada a partir do petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Biossurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas tensoativas (surfactante) subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Devido as suas propriedades de diminuir a tensão interfacial e formar micelas, os biossurfactante podem alterar o comportamento interfacial e também a relação de outras moléculas na interface e em solução (VAN HAMME et al., 2006). Estes produtos possuem propriedades físico-químicas similares, tais como, as dos surfactantes sintéticos, entretanto oferecem vantagens sobre eles. São muitas as vantagens apresentadas pelo biossurfactante quando comparado aos de origem sintética, tais como: a) alta biodegradabilidade; b) baixa toxicidade; c) biocompatibilidade e biodigestibilidade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos; d) possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais; e) especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos; f) uso em biorremediação de locais impactados por óleo e biodegradação e detoxificação de efluentes industriais; e g) eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (KOSARIC, 2001).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, a mesma molécula possui uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica, e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de hidrofóbica (Figura 2). Que atuam reduzindo a tensão superficial (TS) que é força existente entre uma superfície ar-líquido a tensão interfacial (TI), que é a força existente entre uma superfície líquido-líquido (Figura 2). Essas moléculas reduzem a tensão superficial e interfacial através do acúmulo na interface de fluidos imiscíveis, aumentando a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou orgânicos (SINGH et al., 2007).

Figura 2 - Tipos de agregados formados por biossurfactante.



Legenda: (A) Na CMC os monômeros de surfactante começam espontaneamente a se associar e formar estruturas agregadas conhecidas como micelas, vesículas e lamelas (bicamadas). Exemplo de micelas (B) em uma solução aquosa, o grupo polar da micela vai estar orientado para fora e a porção apolar para dentro, (C) enquanto no óleo o grupo polar estará orientado para dentro das micelas e a porção apolar para fora.

Fonte: adaptado de Maier, 2003.

2.5 Classificação e natureza química dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes são considerados uma classe de surfactantes naturais, sendo classificados pela natureza química e pela espécie microbiana produtora. Os biossurfactantes são moléculas complexas com uma grande diversidade de estruturas químicas. Embora a produção de biossurfactantes ocorra entre os diferentes grupos microbianos, muitas vezes o tipo de biossurfactante produzido é específico do gênero e às vezes da espécie. Por exemplo, a *P. aeruginosa* produz um glicolípido (rammolípido) e a *P. fluorescens* produz a viscosina e a tensina, identificadas como lipopeptídeos (MAIER; SOBERÓN-CHAVEZ, 2000).

Os microrganismos produzem uma ampla variedade de biossurfactantes de alto e baixo peso molecular. Os de baixo peso molecular são geralmente glicolípídeos ou lipopeptídeos que são mais eficazes em reduzir a tensão interfacial e superficial. Os de alto peso molecular, que são polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteína anfipáticas, são estabilizadores eficazes de emulsões óleo/água (VAN HAMME et al., 2006). Os biossurfactantes podem ser classificados conforme sua estrutura, os principais são os glicolípídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolípídios e ácidos graxos, polímeros e biossurfactantes particulado (Tabela 5).

Entre os surfactantes, os glicolípídios são os mais estudados, cuja natureza anfipática permite que funcionem como detergentes biodegradáveis naturais (CHRISTIE, 2013). Constituído por moléculas de carboidratos (glicose, manose, galactose ou ramnose) em combinação com ácidos alifáticos de cadeia longa, sendo mais conhecidos os: ramnolípídeos, trehalolípídeos e soforolípídeos (HOLMBERG, 2001). Estes biossurfactantes podem ser aplicados em emulsões, pois possuem capacidade umectante, e em mistura com propilenoglicol apresenta capacidade higroscópica. Por essas razões podem ser utilizados na formulação de produtos cosméticos (CAVALERO; COOPER, 2003).

Lipoproteínas também referidas como lipopeptídeos, são uma das classes de biossurfactantes mais estudadas e melhor caracterizadas devido às suas propriedades antibióticas e antimicrobianas (BARROS et al., 2007; BODOUR; MAIER, 2002). E segundo Colla e Costa (2003) podem ser utilizadas em processos de biorremediação de solos e águas contaminadas com hidrocarbonetos, bem como na remoção de metais pesados e ou óleo como o petróleo derramado.

Tabela 4 -Principais classes de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

Tipos de biossurfactante	Principais microrganismos	Tensão Superficial (mN m⁻¹)	CMC (mg.L⁻¹)	Tensão Interfacial (mN m⁻¹)
Glicolipídios				
Rammolipídios	<i>Pseudomas aeruginosa</i>	29	0.1 - 10	0,25
Trehalopídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32	4	14 -17
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicula</i>	33	-	1,8
Celobiolipídios	<i>Ustilago zaeae,U. maydis</i>	-	-	-
Lipopeptídeos e Lipoproteínas				
Peptídeos-lipídios	<i>Bacillus licheniformis</i>	27	12 - 30	0,1 -0,3
Serravectina	<i>Serratia marcescens</i>	28	-	-
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26	150	-
Sufactina	<i>Bacillus subtilis</i>	27	23 -160	1
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
Gramixidina	<i>Bacillus brevis</i>	-	-	-
Polimixina	<i>Bacillus polimixa</i>	-	-	-
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>	30	150	2
Lipídios neutros	<i>Nocardia spp.</i>	32	-	3
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus tiooxidans</i>	-	-	-
Surfactantes Poliméricos				
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>			
Biossurfactantes particulados				
Vesícula e fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>			
Células	Várias espécies bacterianas			

Fonte: adaptada de Desai e Banat, 1997 e atualizada com bibliografias mais recentes.

Moléculas como os fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos graxos fazem parte da estrutura da célula e também apresentam propriedades biossurfactantes, tendo

capacidade de solubilizar enxofre e aumentar a solubilidade do hexadecano (MAIER, 2003). Kitamoto et al., (2009) afirmam que os fosfolípidos, são os principais componentes da membrana celular considerados uma classe de biossurfactantes, mas no entanto a sua produção está ainda pouco estudada e suas aplicações indefinidas.

Os biossurfactantes poliméricos são caracterizados pelo alto peso molecular podendo ser grandes cadeias de carboidratos, proteína ou ter uma fração lipídica (BENTO et al., 2008). Os mais bem estudados representantes dessa classe são Biodispersan, Emulsan e Liposan® (Primex, Islândia) sendo todos complexos de polissacarídeos com proteínas (RON; ROSENBERG, 2001). O Emulsan foi o primeiro surfactante microbiano a ser produzido e comercializado em larga escala e é um dos mais efetivos emulsificantes, produzido a partir de culturas de *Acinetobacter calcoaceticus* (ROSENBERG; RON, 1999). Podem ser encontrados comercialmente com propriedades biodispersantes, biofloculantes e bioespessantes (GUTNICK et al., 1993).

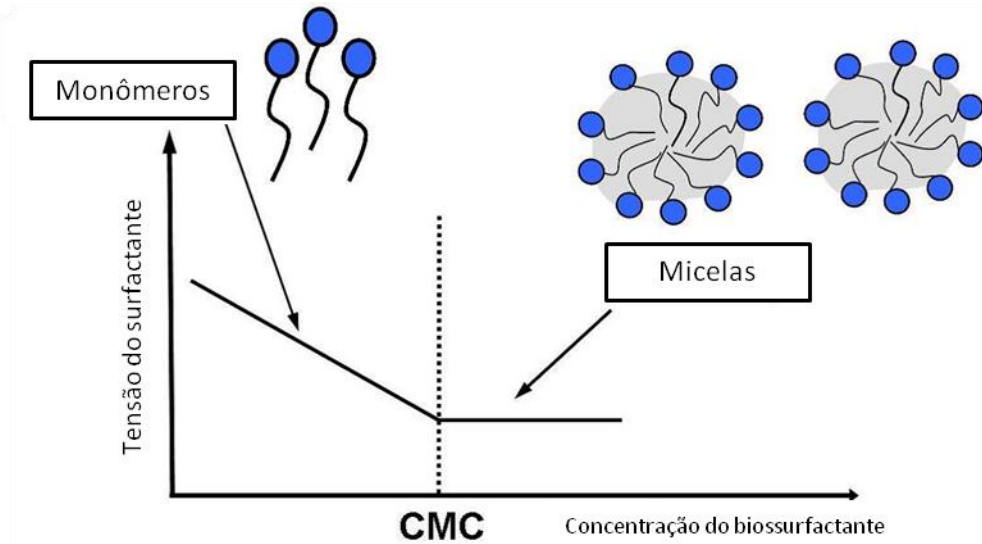
Bactérias do gênero *Acinetobacter* produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante (KÄPPELI; FINNERTY, 1979). Nitschke e Pastore (2002) afirmam que as vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biossurfactantes particulados.

2.6 Eficiência dos biossurfactantes

Segundo Mullian (2005), a eficácia de um biossurfactante é determinada por sua habilidade em diminuir a TS, pois este interage com a molécula de água e diminui o trabalho requerido para trazê-la à superfície do líquido. Outro parâmetro que determina a eficácia de um surfactante é a concentração micelar crítica (CMC) (Figura 3), que é a menor concentração de surfactante na água onde ocorre a formação de micelas. Após este ponto, mesmo com o aumento da concentração de surfactante na solução, a TS permanece constante. Quanto menor é o valor de CMC, maior a eficiência do biossurfactante. Como resultado, os surfactantes reduzem as forças de repulsão entre as fases nas interfaces ou superfícies, permitindo que as duas fases se misturem facilmente. Sendo assim, pode-se dizer que a CMC é uma importante característica dos surfactantes no que diz respeito à

avaliação de sua eficiência. Os biossurfactantes possuem menor CMC (0,001 – 2 g/L) em comparação aos surfactantes sintéticos. Como exemplo tem se o SDS (dodecil sulfato de sódio), um dos surfactantes químicos mais comuns, que possui uma CMC de 2,4 g/L (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Com base nessas características, os biossurfactantes são tidos como mais eficientes que seus homólogos químicos, pois exercem o mesmo efeito em concentrações muito menores.

Figura 3 - Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo.



Fonte: adaptado de Mulligan, 2001.

Normalmente, uma mistura de óleo e água forma fases separadas. Entretanto, se a mistura é vigorosa, o óleo vai dispersar na fase aquosa. Se a agitação cessar, as fases se separam rapidamente. Quando se adiciona um surfactante, é obtida uma mistura estável ou uma emulsão. Para a formação de gotas de óleo na água é preciso que o emulsificante seja solúvel em água e a porção hidrofóbica do bioemulsificante será adsorvida na fase oleosa dispersa e a porção hidrofílica ficará na interfase. A estabilidade da emulsão é garantida pela formação de filmes na superfície das gotículas de óleo na fase aquosa, que tende a se manter por longos períodos, refletindo a efetividade do emulsificante. Logo, ocorrerá a formação de uma gota de óleo carregada na superfície e provocará a repulsão das partículas com carga semelhante, o que evita a coalescência e confere a estabilidade da emulsão (Figura 3). As emulsões representam uma grande área

interfacial e se formam à medida que a tensão é reduzida, e a estabilidade dependerá da natureza do emulsificante e das condições do meio (MAIER, 2003). O principal papel fisiológico atribuído aos biossurfactantes é permitir que os microrganismos crescessem em substratos imiscíveis em água, pela redução da tensão superficial, tornando-os mais disponíveis para a captação e metabolismo.

2.7 Biorremediação de metais pesados

Por definição, metais pesados são elementos que tem peso específico maior que 5g cm^{-3} . A expressão metal pesado também é usada para designar os metais classificados poluente no meio ambiente (MALAVOLTA, 1994).

Segundo Schiaradia e Pasta (2003) um metal sólido é constituído por átomos metálicos em posição ordenada com seus elétrons de valência livres para se movimentar por todo o metal. Temos então, numerosos átomos metálicos próximos entre si, os elétrons do último nível energético de um átomo serão atraídos indistintamente, pelos núcleos de todos os átomos. Em consequência aparece um “mar” de elétrons vagando pelo metal, movendo-se com facilidade de um átomo para outro, sem se fixarem de modo definitivo em nenhum deles. Os elétrons que constituem esse “mar” de elétrons são chamados elétrons livres. São estes elétrons os responsáveis pela ligação metálica. Sem seus elétrons do último nível energético, os átomos metálicos se transformam em cátions, isto é, em íons de carga elétrica positiva. Portanto a ligação metálica é um agregado de cátions mergulhados em um “mar” de elétrons livres. Os metais são constituídos pelos seus cátions mergulhados num mar de eletros (ROMEIRO, 1997).

Os metais pesados no solo originam-se da intemperização dos materiais de origem e de fontes antropogênicas como pesticidas e fertilizantes, rejeitos orgânicos e industriais, mineração e queima de combustíveis, irrigação e decomposição atmosférica. Tem-se verificado ao longo do desenvolvimento tecnológico mundial, uma contribuição crescente das fontes antrópicas de metais para o solo, o que resulta na poluição de extensas áreas e no avanço do impacto negativo desses sobre o meio ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os principais metais poluidores e respectivas fontes mais importantes encontram-se na Tabela 6.

Tabela 5 - Principais fontes antrópicas de metais tóxicos e elementos relacionados.

Metal	Atividade			Metalurgia		Agri- cultura	Manufa- turados	Rejeitos sólidos	Lodo de esgoto
	Carvão	Petróleo	Energia	Não ferrosa	Ferrosa				
As	X*			X		X	X		X*
Cd	X*			X		X	X		X*
Cr	X*		X	X	X	X*	X*	X	X
Cu	X	X		X*			X	X*	X*
Hg	X*		X			X*		X*	
Mn	X*		X	X	X	X*	X	X	X
Ni	X*	X	X	X		X			X*
Pb		X*		X			X	X*	X
Se	X*								
V	X	X*				X			
Zn	X		X	X	X	X*	X	X	X*

Legenda: *Fonte com maior contribuição relativa para a concentração de metais no solo.

Fonte: adaptada de Moreira e Siqueira (2006).

O termo biorremediação, no caso dos metais pesados, pode parecer inapropriado, já que nenhum processo pode degradar ou eliminar elementos inorgânicos, no entanto, em alguns casos sua imobilização mediada pelos microrganismos pode ser a única forma praticável para proteger águas subterrâneas e a cadeia alimentar de uma contaminação (SPROCATI et al., 2006).

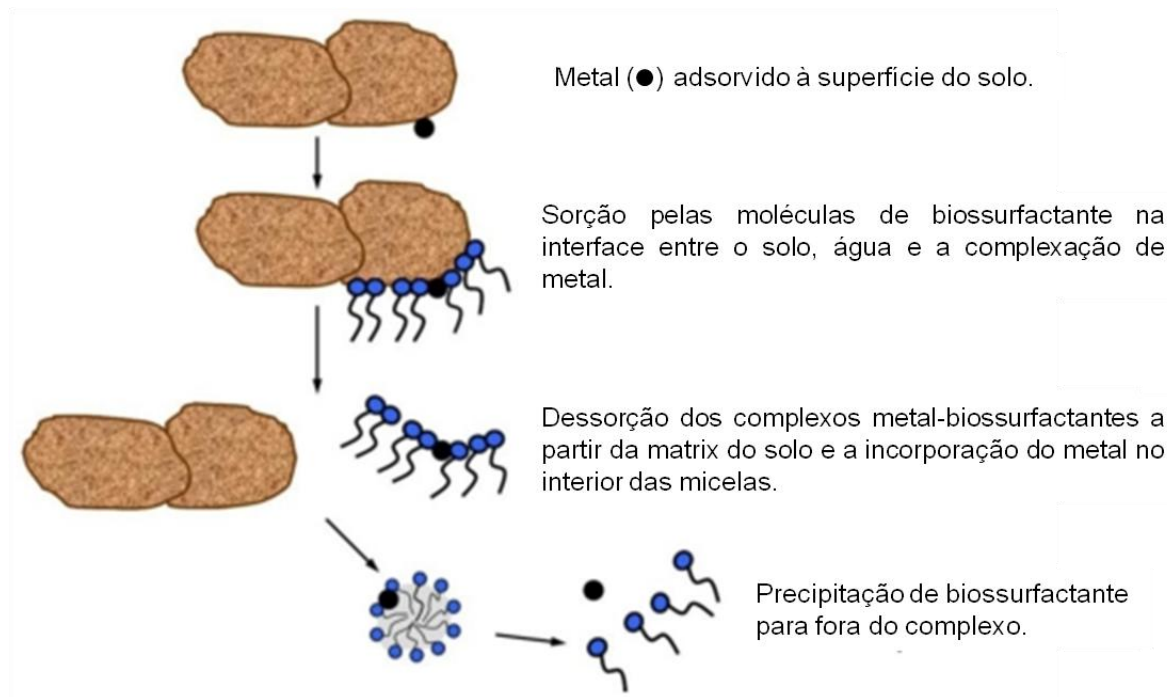
A remoção de metais, que geralmente inclui a ação de ácidos e solventes solúveis em água, pode ser realizada pela ação de biosurfactantes (MULLIGAN et al., 1999). O mecanismo bioquímico microbiano não consiste na degradação do átomo contaminante, mas na mudança do estado de oxidação do metal, permitindo a sua detoxificação. Independentemente das reações que ocorrem, provavelmente, o metal ainda permanecerá no local, pois se sabe que as bactérias possuem capacidade para concentrar ou remover os mesmos, seja em forma de precipitados ou de substâncias voláteis, transformando as espécies em compostos menos tóxicos e mais facilmente disponíveis. Desse modo, os microrganismos podem apenas alterar a especiação dos contaminantes e convertê-los em formas não tóxicas (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Pianna (2001), afirma que esta troca de oxidação permite que várias estratégias de biorremediação sejam seguidas: a) metal se torna menos solúvel e precipita o que permite que esteja menos disponível para os organismos do ambiente. b) tornam-se mais solúveis, o que facilita sua remoção pela permeação através da sua membrana celular. c) permite que possa haver uma volatilização do

elemento e/ou do composto. d) converte-se em um produto menos tóxico para os organismos do meio.

De acordo com Mullian (2005) além dos biossurfactantes terem aplicação na biodegradação de contaminantes orgânicos, também podem ser usados para remover metais de sistemas, devido à sua capacidade de complexação e/ou quelação. Sua composição complexa apresenta sítios de ligação potenciais para o sequestro de íons metálicos. Vários autores descrevem a utilização dessas substâncias na biossorção de metais pesados (MASLIN; MAIER, 2000; NITSCHKE; PASTORE, 2002; ZHANG et al., 2006).

Figura 4 - Princípio do mecanismo de atividade do biossurfactante em solo contaminado por metais.



Fonte: adaptado de Mulligan (2005).

A utilidade de biossurfactantes para a biorremediação de solos contaminados por metais pesados está baseada principalmente na sua capacidade de formar complexos com metais (complexação). Os biossurfactantes aniônicos criam complexos metálicos de forma não iônica, ou seja, criam pontes de ligações iônicas. Estas acabam sendo ligações mais fortes do que as ligações que ocorrem com o metal e as partículas do solo, formando-se assim os complexos metal-biossurfactante. Uma vez estes metais complexados são dessorvidos da matriz do

solo devido à redução da tensão interfacial. Os biossurfactantes catiônicos podem substituir quaisquer íons metálicos carregados igualmente, pela concorrência, mas nem todos os que possuem superfícies carregadas negativamente (troca iônica). Assim, esses íons metálicos são removidos da superfície do solo também por micelas formadas pelo biossurfactante. Da mesma forma, essas micelas de biossurfactantes hidrossolúveis, cujos ápices são polares, podem vincular metais dissolvidos na água (AŞÇI et al., 2008; MULLIGAN; GIBBS, 2004; SINGH; CAMEOTRA, 2004).

A biorremediação pode ser feita utilizando os biossurfactantes diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser adicionados diretamente os microrganismos produtores ou fontes de nutrientes para promover o crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos.

2.8 Áreas de aplicação

De acordo com Marquez *et al.*, (2009) os biossurfactantes são mais eficazes e eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes, e apresentam propriedades que estes não possuem. A sua utilização em uma variedade de aplicações devido as suas propriedades e grande versatilidade somada à crescente importância da aceitabilidade ambiental devido a sua biodegradabilidade e ausência de toxicidade tem aumentado a sua demanda. Segundo Al-Araji et al., (2007) tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (Tabela 4). No entanto, sua entrada no mercado em larga escala ainda está limitada, devido ao seu alto custo de produção quando comparados aos sintéticos.

Uma das áreas de maior aplicação de surfactantes é na indústria petrolífera. Esses produtos são efetivos em reduzir a tensão interfacial entre óleo e água nos poços de petróleo, além de reduzirem sua viscosidade, facilitando sua remoção ou recuperação antes do processamento (LIU et al., 2004). Outras aplicações importantes são na biorremediação de sítios contaminados, tornando poluentes biodisponíveis à sua biodegradação, na indústria de alimentos os biotensoativos são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias primas (BANAT et al., 2000). O uso em cosméticos deve-se as suas propriedades umectantes, baixo grau

de irritação e compatibilidade com a pele, assim como as propriedades espumantes (MAIER; SOBERÓN-CHAVEZ, 2000). A sua atividade antimicrobiana tem aberto novas perspectivas de utilização comercial. Por exemplo, na medicina, pois além de possuírem elevada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, alguns biossurfactantes podem atuar impedindo a fixação de agentes patógenos, tornando sua utilização interessante no tratamento de algumas doenças, atuando como agente terapêutico e probiótico (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Tabela 6 - Mecanismo de atuação de biossurfactantes e suas aplicações industriais.

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos.
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene.
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas.
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura*.
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e fixação de minérios.
Agentes espessantes	Tintas e alimentos.
Sequestrantes de metais	Mineração**
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas.
Fator de crescimento microbiano	Tratamentos de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo.
Redutores de viscosidade	Transportes em tubulação, oleodutos.
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcário-água.
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

** - Ag, Au, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pd, U, Th e Zn; * - Degradação de pesticidas como Atrazine;
 Fonte: adaptado de Abbas, 2003.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta dissertação é determinar uma metodologia de estudo e isolamento de microrganismo com potencial produtor de biossurfactante a partir de áreas contaminadas com metais pesados e derivados de petróleo e seu potencial de uso em processo de biorremediação de cátions metálicos.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Isolar e caracterizar linhagens bacterianas com propriedades produtoras de substâncias surfactantes de locais contaminados;
- Estudar a síntese de biossurfactante por linhagens selecionadas, através de parâmetros controlados;
- Verificar a estabilidade do biossurfactante frente a diferentes pHs, a força iônica (NaCl) e estabilidade térmica;
- Avaliar a eficácia do biossurfactante em processo de complexação de metais (Ni, Cr e Mn).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Meios De Cultura

Neste estudo foram utilizados os seguintes meios de cultura: Ágar Nutriente, Caldo BHI (Brain Heart Infusion), Água Peptonada a 0,1%, Caldo Nutriente (Meio Complexo), PBS (Phosphate Buffer Solution) cujas composições estão descritas abaixo.

4.1.1 Caldo e Ágar Nutriente

Extrato de carne..... 3,0 g/L
 Peptona bacteriológica..... 5,0 g/L
 Para obtenção do ágar nutriente, adiciona-se-20 g/L de ágar.

4.1.2 Caldo BHI

BHI..... 0,75g
 Água destilada..... 20ml

4.1.3 Água Peptonada a 0,1%

Peptona Bacteriológica..... 0,1%
 Água destilada 100ml

4.1.4 PBS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$3,046g
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$0,207g
 NaCl.....8,766g
 Água destilada.....1L

A coleta de solos, seleção e identificação de microrganismos realizaram-se de acordo com as etapas a seguir.

4.2 Esterilização

Os materiais de coleta, como vidro com tampa e espátula, os meios de cultura, soluções, todos os utensílios utilizados e instrumentos em geral, foram esterilizados em Autoclave Vertical CS/Prismatec Autoclaves por 10 minutos a 121°C.

4.3 Coletas.

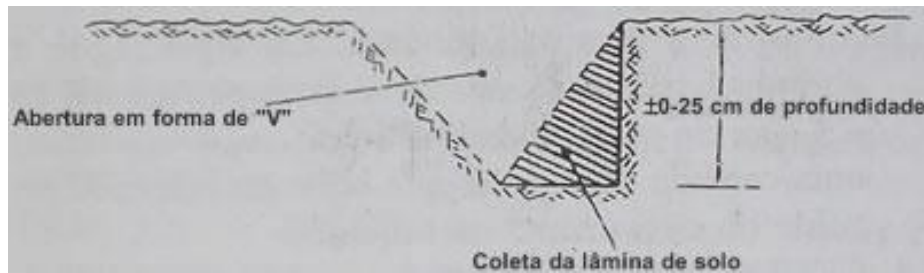
4.3.1 Locais das coletas.

As amostras de solos foram coletadas nos Bairros na cidade de Canoas no Estado do Rio Grande do Sul. Os locais escolhidos aleatoriamente foram: quatro oficinas mecânicas, sete ferros-velhos, um posto de combustível, dois posto de lavagem de automóvel e uma da REFAP, totalizando 15 locais de amostras devidamente autorizadas, descrito no item 4.3.3.

4.3.2 Técnica de coleta de solo

As amostras foram retiradas da camada superficial do solo, até a profundidade de 20 cm, tendo antes o cuidado de limpar a superfície dos locais escolhidos, removendo os detritos. A lâmina de solo (Figura 5) foi retirada com uma espátula e colocada em um vidro com tampa devidamente esterilizado.

Figura 5 - Profundidade e modo de coleta de amostra de solo.



Fonte: AgroLab (2012)

4.3.3 Identificação e descrição dos locais de coleta.

Os locais foram devidamente identificados da seguinte forma:

Onde: "x" representa o número de locais de coleta;

"y" representa o número de linhagens isoladas daquele local;

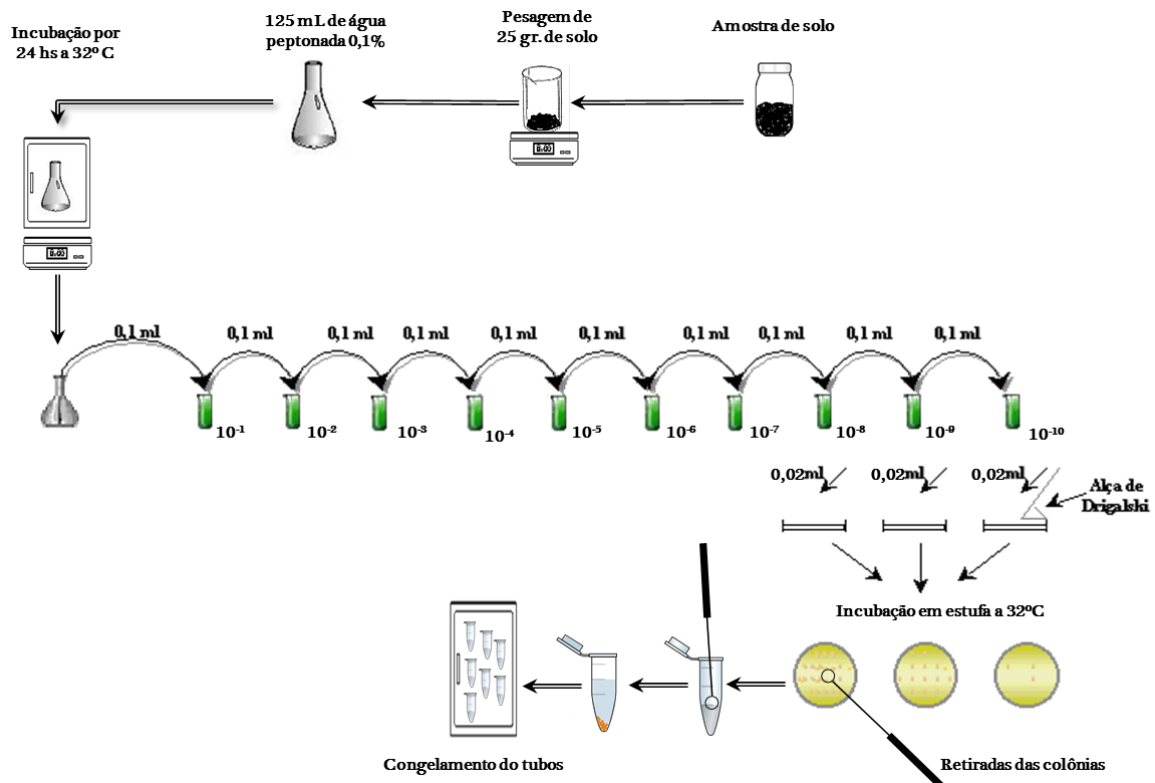
"M" (mecânica); "L" (Posto de lavagem de automóvel); "P" (posto de combustível); "F" (ferro-velho).

- LxMy - Oficina Mecânica (conserto de automóveis de pequeno e médio porte, tais como: reforma de motor, freios, suspensão, embreagem, direção, caixa de câmbio, troca de óleo, líquido de freio, etc.);
- LxFy – Ferro-velho (todo o tipo de metal descartado procedentes de desmanches de automóveis, baterias, carcaças de eletrodomésticos e eletrônicos, autopeças, latinhas de produtos alimentícios, latas de outros produtos como tintas, grades, esquadrias, alicerces de construções, etc.);
- LxPy - Posto de Combustível (abastecimento de gasolina, álcool e óleo diesel, troca de óleo e lavagem de automóvel);
- LxLy – Posto de Lavagem de Automóvel (lavagem de automóveis de pequeno a grande porte em geral como lataria, motor, carpetes, forração, estofados, etc. utilizando detergente, ácidos, solventes, desengraxantes, xampu especial, silicone, jato de cera, etc.);

4.4 Isolamento e manutenção dos microrganismos.

Os microrganismos foram coletados a partir de amostras de solos provenientes de áreas impactadas. O isolamento foi obtido através da técnica de diluições seriadas, onde 12,5 mL de amostra foram homogeneizadas em 125 mL de água peptonada 0,1% que ficou 24hs na estufa bacteriológica (Nova Ética Mod: 410 – 4ND) a 32°C em aerobiose. Desta solução foram realizadas diluições decimais até 10^{-10} . Desta diluição foi retirada uma alíquota de 0,02mL em placas de Petri contendo Ágar Nutriante (AN) realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 32°C, durante 24 horas. Das placas com crescimento, cuja diluição permitiu que colônias se desenvolvessem de maneira isolada e com possibilidade visualização e interpretação da morfologia, foram selecionadas e transferidas cada uma das 106 linhagens bacterianas para um tubo *ependorf* contendo Caldo BHI e glicerol e em seguida estocadas a 4°C, para posterior identificação e demais procedimentos de investigação, conforme mostra a Figura 6.

Figura.6 - Esquema do processamento da amostra em laboratório



Fonte: Autoria própria 2013.

4.5 Seleção de linhagem produtoras e Índice de Emulsificação (IE%).

Em tubos de tampa rosca com 8 ml de Caldo Nutriente, devidamente esterilizados, foram inoculadas as 106 linhagens bacterianas estocadas que permaneceram por 96 hs na estufa a 32°C. O líquido foi utilizado para determinar o índice de emulsificação pelo método descrito por Bicca et al., (1999). Para determinação do índice foram utilizados 3,5 ml do sobrenadante e 2 ml de tolueno, homogeneizado em vórtex (IKA Mod: LAB DANCER) por 2 minutos, a 25° C. A leitura foi realizada através de medição da altura da emulsão formada após dois minutos de repouso (T_0). As leituras foram repetidas com 24 horas (T_{24}) e uma semana de repouso (TS_7) para verificar a estabilidade da emulsão. O índice de emulsão (IE%) será calculado através da equação:

$$IE \% = \frac{He}{Ht} 100$$

Onde: He = altura da emulsão;

Ht = altura total do líquido.

4.6 Produção de Biosurfactante

Das 106 bactérias foram escolhidas dez linhagens que tiveram maior índice de emulsificação e que permaneceram instáveis, conforme foi determinado no item 4.5.

As dez linhagens foram mantidas e cultivadas em *erlemeyer* de 250 mL contendo caldo nutriente em incubadora orbital (Shaker Nova Ética Mod: 430.RDBPE) nas seguintes condições de bioprocesso: 32 °C, aeração constante e agitação de 60 rpm, com esferas de vidros (para dar maior área de atrito e superfície nos frascos). A recuperação primária do surfactante foi realizada pela remoção da biomassa por centrifugação na (Centrífuga Excelsa II modelo 206 BL), onde sobrenadante foi acidificado com solução 2 M de HCl para pH 2,0 e a biomassa, novamente centrifugada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em água. O pH foi elevado para 7,0 com solução 1 M de NaOH e o precipitado, seguido por secagem em estufa a 50 °C. Após secagem do

produto, foi feita extração com clorofórmio/metanol (65:15), utilizando uma relação de biossurfactante semipurificado para solução de extração de 2,5:1 e novamente seco em estufa (COSTA, 2005; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). O produto obtido foi identificado como Biossurfactante Semipurificado (BSP) e utilizado nos experimentos posteriores.

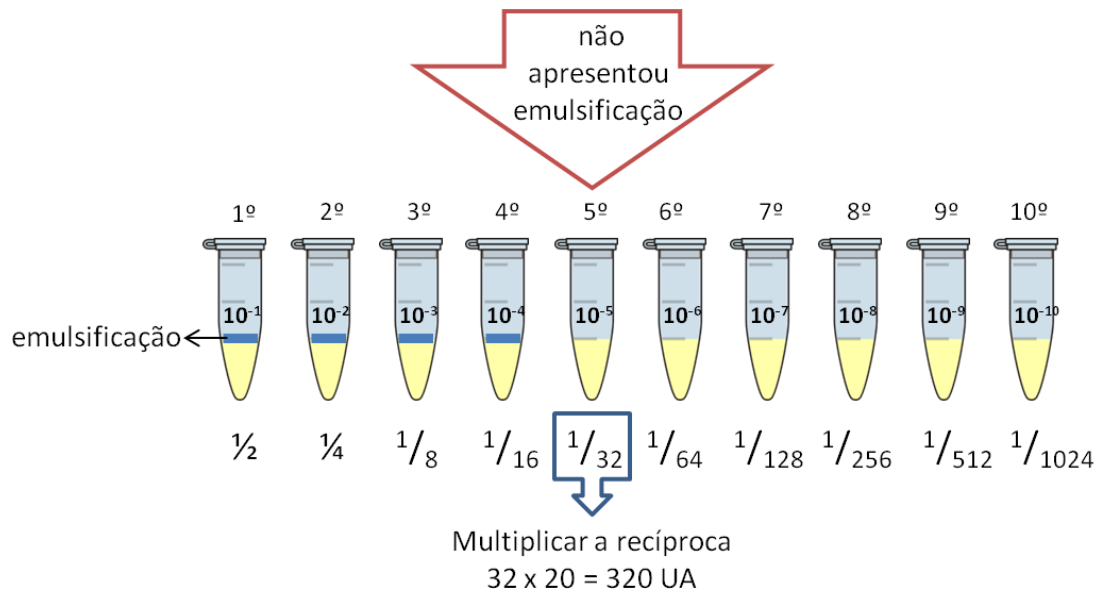
4.7 Identificação das bactérias

As dez linhagens bacterianas escolhidas provenientes de oficina mecânica, posto de combustível, posto de lavagem de automóvel e ferro-velho foram submetidas aos procedimentos de caracterização e identificação: Coloração de Gram, Meio SIM, Meio Ágar Citrato Simmons, Meio Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI), Caldo Base Bromocresol Púrpura, Oxidase e Catalase. A caracterização das linhagens foi seguindo os protocolos de identificação da morfologia colonial, microscópica e características segundo a metodologia estabelecida por Barrow e Feltham, (1993) e Koneman et al., (2008).

4.8 Determinação das Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA ϵ /ml)

Cada BSP foi submetido à determinação de UA ϵ /ml. Foi feita uma diluição seriada 10^{-10} do BSP em *ependorf*. Foram colocados 50 μ l de BSP, 450 μ l de PBS e 285 μ l de tolueno e agitado em vortex. Verificou-se onde a diluição não mais apresentou atividade emulsificante. Os *ependorfs* ficaram na seguinte ordem: 1 $^{\circ}$ $1/2$; 2 $^{\circ}$ $1/4$; 3 $^{\circ}$ $1/8$; 4 $^{\circ}$ $1/16$; 5 $^{\circ}$ $1/32$; 6 $^{\circ}$ $1/64$; 7 $^{\circ}$ $1/128$; 8 $^{\circ}$ $1/256$; 9 $^{\circ}$ $1/512$; 10 $^{\circ}$ $1/1024$. O cálculo para a determinação da concentração de BSP foi feito de acordo com os seguintes preceitos: Tomando-se por base a diluição do último frasco que não apresentou emulsificação, este foi multiplicado pela sua recíproca, obtendo-se então um referencial para se estabelecer a concentração do biossurfactante na solução, que foi expressa em UA ϵ /ml.

Figura 7 – Exemplo do cálculo de Unidades Arbitrária de Emulsificação (UA_E/ml).



Fonte: Autoria própria 2013.

4.9 Determinação do efeito do NaCl, Temperatura e pH na atividade biossurfactante

4.9.1 Estabilidade frente à força iônica:

Para a determinação da estabilidade frente à força iônica foram preparados três frascos *beckers* no volume de 15 ml, cada um recebendo NaCl nas seguintes concentrações: 5; 10; e 20% (m/v). Cada amostra de BSP foi fracionados em três *ependorfs*, cada um recebeu 50 µl de BSP e 450 µl de NaCl. Foram mantidos por 30 min em banho-maria da marca Biopar LTDA modelo BMD01 à temperatura de 25 ± 1°C, após esse período foi testada a capacidade de emulsificação com a adição de 285 µl de tolueno e homogeneizado em vórtex.

4.9.2 Estabilidade frente ao pH

Para a determinação da estabilidade frente a diferentes pHs foram preparados em frasco *beckers* contendo 15 ml de tampão fosfato salino (PBS). Cada frasco teve seu conteúdo ajustado para os seguintes valores de pH,

respectivamente: 2, 6 e 9, por meio de adição de HCl 1 e 0,1 N ou NaOH 1 e 0,1 N. Cada amostra de BSP foi fracionada em três *ependorfs*, cada um recebeu 50 µl de BSP e 450 µl de PBS. Foram mantidos por 30 min em banho-maria à temperatura de 25 ± 1 °C, após esse período foi testados quanto à capacidade de emulsificação com a adição de 285 µl de tolueno e homogeneizado em vórtex.

4.9.3 Estudo de estabilidade térmica

Para a determinação da estabilidade térmica cada amostra de BSP foi fracionada em três tubos com tampa rosqueada. Cada tubo recebeu 50 µl de BSP e 450 µl de PBS. Os tubos serão submetidos às seguintes temperaturas: 80, 100 e 121 °C por períodos de 15, 30 e 60 minutos, após esse procedimento foram testados quanto à capacidade de emulsificação com a adição de 285 µl de tolueno e homogeneizado em vortex.

4.10 Determinações da Concentração Micelar Crítica (CMC)

4.10.1 Determinação CMC pelo método tensiométrico

Os BSP escolhidos para a determinação de CMC foram previamente preparados para posterior determinação da TS. Para tanto foram liofilizados em liofilizador LIOTOP-LIOBRAS®, modelo L101, em frasco de 50 mL. A partir do volume seco liofilizado foram pesadas e ressuspensas em água, num volume igual para todos os BSP, compondo a solução estoque com uma concentração de 50 mg/mL (p/v).

Nesta etapa, a CMC de dez BSP (com maior IE%), foi determinada através de mudanças na tensão superficial, para as várias concentrações testadas. As soluções de BSP utilizadas para a determinação da CMC foram preparadas a partir solução estoque, diluídas nas seguintes concentrações: 2, 5, 6, 8,10, 15, 20 e 30 mg/mL. Os sistemas de diluições utilizados foram com água deionizada (Milli-Q®, resistividade ~18 MΩ.cm, pH 6,5) e tampão fosfato de salino (PBS) com pH 7,0, na concentração de 10 mmol/L. O mesmo sistema de diluição dos BSP em água foi utilizado também para o tampão fosfato.

As medidas de TS foram obtidas utilizando um tensiômetro Kruss GMBH, modelo K 8, com escala de divisão de 0,1 mNm equipado com um anel de Pt-Ir-20. A CMC foi determinada a partir da inflexão da curva de TS das soluções diluídas em função da concentração de BSP.

4.10.2 Determinação CMC por espectrometria de absorção UV-Vis

Dos dez BSP testados no item 4.10.1 foram separados três com menor CMC para a realização da determinação CMC por espectrometria de absorção UV-Vis.

A avaliação inicial do potencial de solubilização dos BPS foi realizada de acordo com um procedimento originalmente proposto por Zhou e Rhue (2000) onde 5 mL da solução de biossurfactante (2,5% m/v) foram transferidos para um frasco de 10 mL, ao qual foram adicionados 0,5 mL de uma solução de corante Sudam III na concentração de 0,001 g/mL. O corante Sudan III foi utilizado para identificar a formação das micelas.

Os espectros na região do visível foram obtidos com um espectrofotômetro Hitachi, modelo U3501, lidos na faixa (λ) de 504 nm.

4.11 Avaliação da Capacidade de remoção de metais

4.11.1 Seleção de bactérias produtoras de biossurfactante

Das dez bactérias com capacidade de biossurfactação foram separadas as linhagens: L3F4, L4F6 e L1P4, sendo que as duas primeiras são procedentes de solos de ferros-velhos e a terceira é procedente de posto de combustível por apresentar o menor CMC. Foi realizado o mesmo procedimento do item 4.6, somente com um volume de 500 ml de caldo nutriente.

4.11.2 Preparo das soluções de Níquel, Manganês e Cromo.

Para cada cátion metálico, foi feita uma solução em balão volumétrico de 1L obtendo uma solução com concentração de 30mg/L.

4.11.3 Remoção de cátions (Ni, Mn e Cr).

Para os testes de complexação de metais seguiu-se o método descrito por (SILVA e JÚNIOR, 2012). Para tanto foram misturados 100 mL de uma solução de 30 ppm de cada metal (Ni, Mn e Cr) com 2mL da uma solução de BSP em frascos *erlemeyer*. Esta mistura foi mantida na incubadora orbital tipo *Shaker* por um período de 30 min a 32°C e depois em repouso na temperatura 26°C por 30 min e centrifugada. Em seguida, foi separada uma alíquota de 10 ml de cada solução de metal mais o BSP, das quais, foram retiradas alíquotas e enviadas para análise laboratorial. As diluições foram todas analisadas por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP – OES) seguindo a metodologia estabelecida no *Standard Methods* 22ed- Método 3120 B [PNT003-AB].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão discutidos resultados referentes aos experimentos realizados relacionando-os com os dados citados na literatura.

A Tabela 7 mostra a designação das amostras, segundo a estratificação dos locais de coleta de solo, as quais foram realizadas em diferentes pontos da cidade de Canoas. Cada local foi retirada uma amostra de solo. Foram escolhidos aleatoriamente 15 locais, a REFAP, um posto de combustível, dois postos de lavagem de automóveis, quatro oficinas mecânicas e sete ferros-velhos. Foram isoladas linhagens bacterianas de cada amostra coletada de cada local, na REFAP e no posto de combustível foram isoladas 7 linhagens de cada local, nos postos de lavagem de automóveis totalizaram 18 linhagens, nas oficinas mecânicas totalizaram 26 linhagens e nos ferros-velhos totalizaram 26 linhagens bacterianas (APÊNDICE A). Estes locais, possivelmente apresentam uma ou mais contaminação por resíduos de lubrificantes, óleos e combustíveis, metais devido ao desmanches, reciclagem de peças, etc., que por consequência estariam contaminando os solos desses locais.

De acordo com a Tabela 8, a presença destes contaminantes no solo, assim como a sua natureza de origem, é fruto do desconhecimento, descaso ou descarte inadequado no meio ambiente.

Neste ecossistema, é possível que microrganismos adaptados a estas condições venham apresentar um metabolismo degradante de tais poluentes, possivelmente bactérias destes locais estariam sintetizando enzimas ou produzindo substâncias naturais com propriedade de agregação, como por exemplo, os biossurfactantes. Assim, permitem que estes microrganismos sobrevivam a sua maneira, ou se destacam por serem os únicos a utilizar os contaminantes como fonte de energia. Bueno (2008), em suas pesquisas também usou amostras de solos de locais sem contaminação e contaminados naturalmente por hidrocarbonetos, provenientes de locais diferentes (solo de borracharia, solo de posto de gasolina, areia do mar contaminada com petróleo, areia do mar sem contaminação e terra fértil), para o isolamento de possíveis bactérias produtoras de biossurfactantes. Mesmo assim, existe um número reduzido de pesquisas com objetivo na prospecção de microrganismo com capacidade produtoras de substâncias surfactantes.

Tabela 7 - Designação e estratificação das amostras de solo, segundo os locais de coleta, realizadas em diferentes pontos da cidade de Canoas e o número de linhagens isoladas de cada local.

AMOSTRA	LOCAIS	LINHAGENS BACTERIANAS ISOLADAS
REFAP	Refinaria Alberto Pasqualini	
REFAP	1	9
LP	Posto de combustível	
L1P	1	7
LL	Posto de lavagem de automóveis	
L1L	1	11
L2L	2	6
LM	Oficina mecânica	
L1M	1	4
L2M	2	8
L3M	3	6
L4M	4	6
LF	Ferro-velho	
L1F	1	4
L2F	2	8
L3F	3	8
L4F	4	8
L5F	5	4
L6F	6	8
L7F	7	9
TOTAL	15 amostras	15 locais
		106 linhagens bacterianas

Fonte: Autoria própria 2013.

Tabela 8 - Locais contaminados e seus contaminantes.

LOCAIS	CONTAMINANTE	ORIGEM
Refinaria de petróleo,	Derivados do petróleo	A contaminação pode ocorrer devido principalmente, aos vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis, acidentes envolvendo veículos transportadores e falhas mecânicas ou humanas nas operações de descarga (DIEMER et al., 2010).
Oficina mecânica	Óleo lubrificante, thinner, solvente, graxa, gasolina, diesel, etc.	É um fato comum devido ao descarte incorreto e vazamentos, principalmente em oficinas mecânicas, e por esses serem mais recalcitrantes, promovem um grande impacto ao meio ambiente em relação a outros tipos de óleos (MACIEL et al., 2010).
Posto de combustível e lavagem de automóveis, Oficina mecânica, Ferro-velho	Hidrocarbonetos	O óleo usado contém elevados níveis de hidrocarbonetos (BORIN e POPPI, 2004). Constituem a maioria dos combustíveis minerais (carvão, petróleo, gás natural, etc.) e biocombustíveis como o plástico, ceras, solventes e óleos. (MIGUEL, 2008)
Refinaria de petróleo, Posto de combustível e lavagem de automóveis, Oficina mecânica, Ferro-velho	Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni) Cádmi (Cd). Alumínio (Al) Magnésio (Mg) Ferro (Fe)	O óleo usado contém elevados níveis de metais (EKANEM et al., 1997) também são encontrados com abundância em produtos de combustão de petróleo e seus derivados (YAMASOE et al., 2000). Disposição de resíduos de ferro velho, destinação inadequada de componentes veiculares contaminando o solo e a água, pois diversos componentes contêm substâncias perigosas, como metais pesados (ZANONI e BOLLMANN, 2007).

Fonte: Autoria própria 2013 devidamente referenciadas.

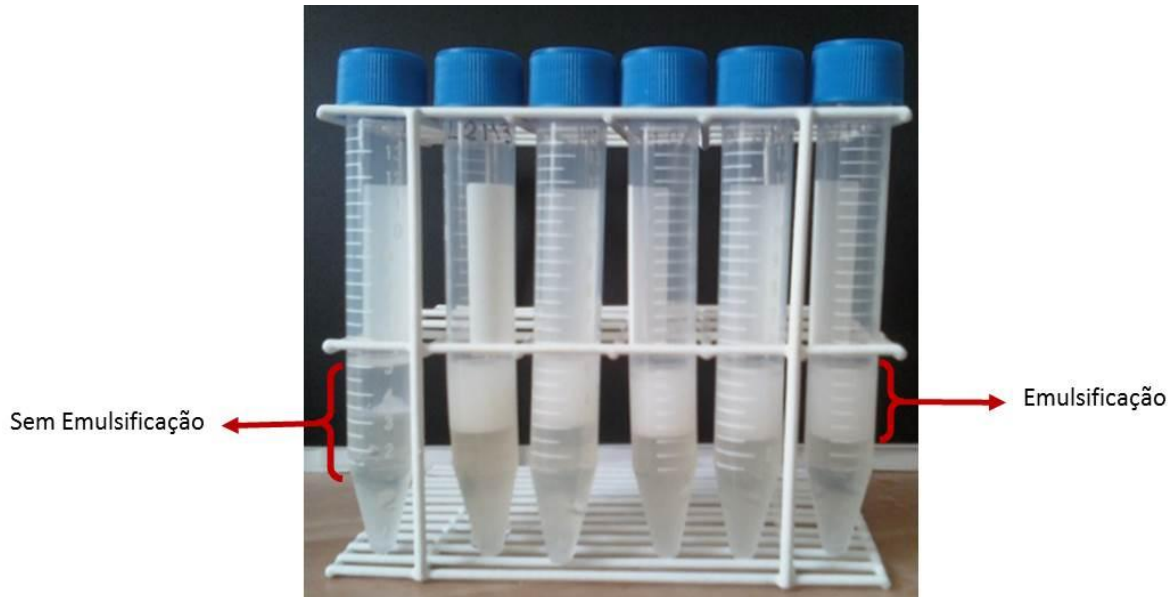
5.1 Determinação do Índice de Emulsificação (IE).

Neste experimento, das 106 linhagens bacterianas isoladas a partir de uma triagem primária, foram separadas 101 linhagens, as quais confirmaram a capacidade de emulsificação após a adição de tolueno. Apenas em 5 linhagens não se verificou índice de emulsificação. A visualização desta etapa está representada na Figura 8.

Uma das evidências de que um microrganismo produz substância surfactante é a capacidade emulsificadora que os líquidos de suas culturas apresentam como reação à presença de substâncias orgânicas. Os biosurfactantes possuem alta capacidade emulsificante e constituem uma alternativa vantajosa aos surfactantes

químicos (convencional) devido às características únicas (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; SINGH et al., 2007).

Figura 8 - Visualização do teste do índice de emulsificação dos sobrenadantes das culturas bacterianas

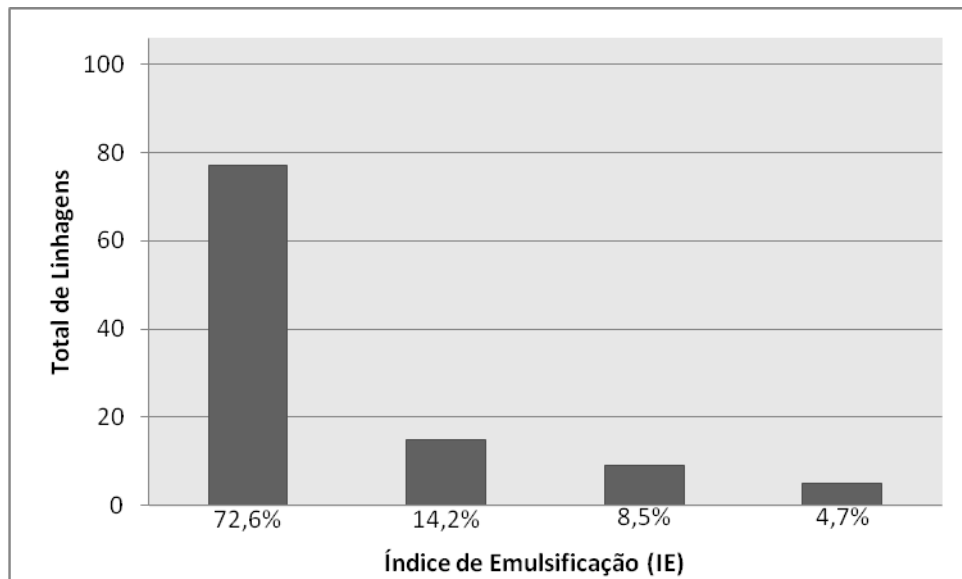


Fonte: Autoria própria 2013.

Um importante parâmetro para avaliação do poder produtivo de biossurfactante é o Índice de Emulsificação (IE), seguido da estabilidade de sua emulsão (COOPER; GOLDENBERG, 1987; COSTA, 2005). Assim, é possível afirmar que, a presença e a quantidade de biossurfactante esta diretamente ligada à intensidade da reação de emulsificação.

Das 106 linhagens bacterianas 77 produzem biossurfactante apresentando um IE de 72,6%, as quais se mantiveram emulsificadas até a TS_7 . Outras 15 linhagens tiveram IE de 14,2% mas não se mantiveram até TS_7 , 9 delas apresentaram baixo IE de 8,5% não se mantendo até TS_7 e 5 (4,7% do total das linhagens) não tiveram nenhuma emulsificação (Figura 9). Nas pesquisas de Peixoto, (2008) de um grupo de isolados, 87 linhagens apresentaram alguma propriedade tensoativa, onde 67 delas apresentaram índice de emulsificação.

Figura 9 - Total de linhagens bacterianas isoladas com capacidade produtora de biossurfactante.

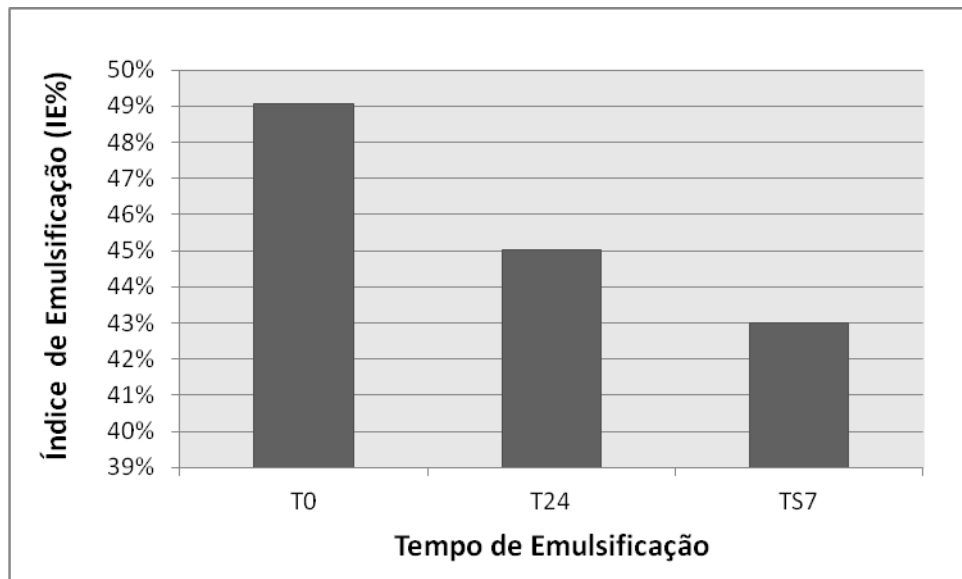


Fonte: Autoria própria 2013.

Das 77 linhagens bacterianas que se mantiveram emulsificadas, foram analisadas quanto às médias do seu IE e observou-se que as emulsões tiveram um declínio de 6,05% nos primeiros sete dias, estabilizando-se após este período (Figura 10). Os estudos realizados por Felix (2012) das emulsões que foram preparadas a partir das culturas das linhagens, a única que apresentou diferença significativa foi a emulsão realizada com o tolueno, verificando-se uma redução da emulsificação de 14,25% no período de 96 horas. Contrariamente, Bueno (2008) que também usou o tolueno para determinar o índice de emulsificação, permaneceu constante por 30 dias sem que ocorresse alteração na porcentagem do índice de leituras das emulsificações.

Como se observa na Figura 10, o IE das primeiras 24 horas foi de 45,03%, não permanecendo estável. Bugay (2009) nas suas pesquisas verificou que a emulsão menos estável foi com tolueno, mostrando um IE de 40% após 24hs, com grande instabilidade. Segundo Bento et al., (2008) uma emulsão é definida como estável, se o IE após 24 horas, for de 50%, assim sendo um bom isolado produtor de biossurfactante.

Figura 10 - Valores do Índice de emulsificação das 77 linhagens bacterianas e sua estabilidade em diferentes tempos.



Fonte: Autoria própria 2013.

Considerando a avaliação do potencial dos biossurfactantes levantados por Bento et al., (2008) indica que grande parte destes tendem apresentar uma diminuição do IE $\geq 50\%$ após 24 horas, no entanto para a maioria das linhagens estudadas neste trabalho apresentaram um decréscimo inferior a 3,5% num período de sete dias.

Na sequência dos ensaios foram separadas dez linhagens bacterianas, entre aquelas que apresentaram uma maior emulsificação, para dar seguimento às avaliações dos seguintes parâmetros: determinação de unidades arbitrárias de emulsificação (UA E/ml), estabilidade frente à força iônica, estabilidade térmica e resistência a variação de pH, avaliação da capacidade de remoção de metais e CMC. Os critérios levados em conta para a sua escolha foram IE ($\geq 50\%$) e tempo de estabilidade, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 - Linhagens bacterianas escolhidas segundo os critérios de índice de Emulsificação e estabilidade.

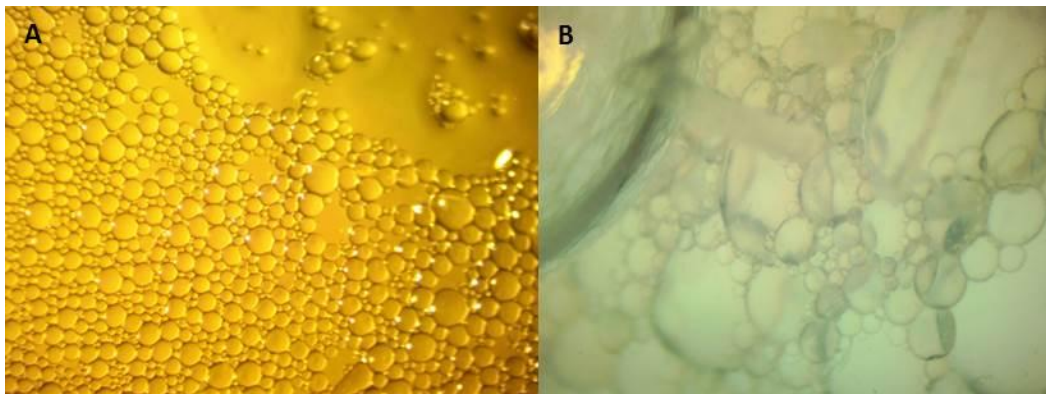
Linhagens Bacterianas	Índice de Emulsificação (IE)		
	T ₀	T ₂₄	TS ₇
1- L1M3	54,5	50,9	45,5
2-L3M6	54,5	45,4	45,4
3-L1L11	56,4	52,7	49,1
4-L1L15	54,5	49,1	49,1
5-L2L3	45,4	45,4	45,4
6-L1P3	54,5	47,3	47,3
7-L1P4	54,5	50,9	49,1
8-L3F4	54,5	49,1	49,1
9-L4F6	56,7	54,5	49,1
10-L6F6	54,5	50,9	49,1

Legenda: T₀ (Índice de Emulsão após dois minutos de repouso); T₂₄ (Índice de Emulsão após vinte quatro horas de repouso); TS₇ (Índice de Emulsão após uma semana de repouso).

Fonte: A autoria própria 2013.

A Figura 11 mostra imagens microscópicas da ação do biossurfactante quando adicionado tolueno e homogeneizado. As moléculas de biossurfactante se ligam as moléculas de tolueno formando assim micelas, e conseqüentemente a emulsão.

Figura 11 - Visualização microscópica micelar da ação emulsificante do biossurfactante (A) L4F6 e (B) L1L11. Ampliação 400x.



Fonte: A autoria própria 2013.

5.2 Identificação das linhagens bacterianas

O processo de identificação dos microrganismos foi efetuado através da determinação de um número mínimo de propriedades. Conforme os autores Silva et al., (2010) para identificar um dado organismo como espécie baseia-se no preenchimento das características atribuídas àquela espécie como o reconhecimento da fonte ou origem da mesma (ambiente, espécie animal, tipo de patologia e localização no ecossistema) do organismo é às vezes fundamental para identificação.

Com as identificações obtidas segundo *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria* (BARROW; FELTHAM, 1993) e Diagnóstico Microbiológico (KONEMAN et al., 2008) (Apêndice A) foi possível identificar espécies representantes dos seguintes gêneros: *Bacillus*; *Pseudomonas*; *Serratia*; *Staphylococcus*; *Xanthomonas* (Tabela 10).

Segundo Pedrinho (2009) o solo constitui-se num dos principais reservatórios de carbono orgânico do planeta terra e um dos mais importantes hábitat para os microrganismos. Há uma alta diversidade de microrganismos no solo devido a sua composição heterogênea (BORNEMAN et al., 1996).

Conforme mostra a tabela 10, cada linhagem bacteriana identificada vem de um local específico. L1M3 e L3M6 são de duas oficinas mecânicas localizados em pontos distintos. O mesmo ocorre com as linhagens: L1L11, L1L15 e L2L3, as quais provem de postos de lavagem de automóveis e L3F4, L4F6 e L6F6 provenientes de três ferros-velhos. Já L1P3 e L1P4 são originárias do mesmo posto de combustível. Os gêneros *Serratia* e *Staphylococcus* aparecem somente em um local específico. Este fato é indicativo de que o solo de onde foram retirados fornecem os nutrientes adequados a cada um deles, para sua atividade metabólica. Já os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* aparecem em mais de um local, indicando que tem mais facilidade de se adaptar em diferentes locais e também indicando que para ambos os gêneros, os fatores físicos e químicos de crescimento são encontrados, igualmente, em todas as áreas de isolamento.

Tabela 10 - Identificação das linhagens bacterianas segundo suas designações amostrais.

Amostras	Linhagens bacterianas
1-L1M3	<i>Bacillus cereus</i>
2-L3M6	<i>Pseudomonas spp.</i>
3-L1L11	<i>Bacillus thuringiensis</i>
4-L1L15	<i>Pseudomonas spp.</i>
5-L2L3	<i>Serratia odorífera</i>
6-L1P3	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
7-L1P4	<i>Pseudomonas cepacea</i>
8-L3F4	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
9-L4F6	<i>Staphylococcus spp.</i>
10-L6F6	<i>Xanthomonas maltophilia</i>

Fonte: Aatoria própria 2013.

5.3 Determinação de Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA_E/ml)

Um método usado para determinar a quantidade de biossurfactante necessário para emulsificar um líquido pode ser calculado pela determinação das unidades arbitrárias de emulsificação (UA_E/ml). Em certos casos, como na atividade enzimática, não se determinam concentrações, mas sim atividades, por isso que se recorre a unidades arbitrárias. O título designado como UA_E/ml foi definido como sendo a recíproca da última diluição que apresentou emulsificação (KIMURA et al., 1998). A determinação desse índice está descrito na Tabela 11.

Na tabela 11 a espécie *Pseudomonas cepacea* proveniente de posto de combustível foi quem apresentou um valor diferenciado de UA_E/ml. isto representa que esta espécie tem capacidade de produzir mais biossurfactante sendo mais eficiente.

Tabela 11 - Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA_ε/ml) de cada bactéria.

Linhagens bacterianas	Unidades Arbitrárias de Emulsificação (UA_ε/ml)
<i>Bacillus cereus</i> 1-L1M3	160 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Pseudomonas spp.</i> 2-L3M6	320 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3-L1L11	160 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Pseudomonas spp.</i> 4-L1L15	320 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Serratia odorifera</i> 5-L2L3	160 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 6-L1P3	320 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Pseudomonas cepacea</i> 7-L1P4	1280 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 8-L3F4	320 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Staphylococcus spp.</i> 9-L4F6	320 UA _ε /ml ⁻¹
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 10-L6F6	160 UA _ε /ml ⁻¹

Fonte: Autoria própria 2013.

5.4 Determinação do efeito do NaCl, Temperatura e pH na atividade biossurfactante

Os biossurfactantes apresentam propriedades que os caracterizam como potenciais insumos em processos industriais. Na medida em que estes processos estão, frequentemente, associados a condições extremas, faz-se necessária uma avaliação da estabilidade desses biossurfactantes (BARROS et al., 2008). A estabilidade do biossurfactante produzidos pelas bactérias foram avaliadas frente à força iônica, pH e variação de temperatura.

5.4.1 Estabilidade frente à força iônica

Quando foram avaliados o comportamento dos BSP frente as diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 5%, 10% e 20% (m/v) foi possível observar que estes tiveram um comportamento emulsificante estável, conforme mostra a Tabela 12. Nas pesquisas de Barros et al. (2008) e Rocha et al., (2007) o biossurfactante testado frente a força iônica também se mostrou estável na tensão superficial em todas as concentrações salinas pesquisadas. Felix (2012) em sua pesquisa constatou que o índice de emulsificação do biossurfactante permaneceu estável em soluções de 2,5 a 10% (m/v) de NaCl, ao nível de significância de 95%, ela afirma que concentrações de NaCl superiores a 10% (m/v) promovem melhor estabilidade das emulsões formadas, sem apresentar diferença significativa entre as

concentrações de 15 e 20% (m/v) de NaCl. Segundo Rocha et al., (2007), esse resultado é interessante quando se considera o uso do biossurfactante na biorremediação em ambientes salinos, como por exemplo, na concentração de petróleo em ambientes marinhos. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que concentrações salinas 3% são suficientes para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Tabela 12 - Efeito da força iônica sobre emulsificação do BSP nas concentrações de 5%, 10% e 20% (m/v) de NaCl.

Linhagens bacterianas	Concentrações de NaCl		
	5%	10%	20%
<i>Bacillus cereus</i> 1-L1M3	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas spp.</i> 2-L3M6	100%	100%	100%
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3-L1L11	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas spp.</i> 4-L1L15	100%	100%	100%
<i>Serratia odorifera</i> 5-L2L3	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 6-L1P3	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas cepacea</i> 7-L1P4	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 8-L3F4	100%	100%	100%
<i>Staphylococcus spp.</i> 9-L4F6	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 10-L6F6	100%	100%	100%

Legenda: (%) porcentagem de emulsificação em triplicata.

Fonte: Autoria própria 2013.

5.4.2 Estabilidade frente ao pH

Quanto ao comportamento dos BSP submetidos as diferentes faixas de pH (2, 6 e 9) foi possível observar que esses, também, tiveram um comportamento emulsificante estável, conforme visto na Tabela 13. Piróllo (2006) em suas análises também constatou que o biossurfactante manteve suas propriedades tensoativas para os valores compreendidos entre 4,5 a 10. Já Rocha et al., (2007) nas suas pesquisas verificaram que tiveram uma diminuição na atividade tensoativa na faixa de pH de 6 a 9, mas em escala de pH de 3 a 5, a atividade tensoativa se manteve praticamente constante. Contrariamente, Rossmann (2008), que ao avaliar a atividade tensoativa do biossurfactante, em pH 4,0, as emulsões formadas não foram consideradas estáveis, correspondiam a valores menores que 50% do volume

original da emulsão, já o índice de emulsificação com valores de pH 6,8, 8,0 e 10,0 se manteve próximo a 60%. Segundo Bognolo (1999), estes resultados são considerados muito interessantes quando se pensa na utilização do biossurfactante em ambientes em condições mais drásticas, como o meio aquático que é alterado sua composição da água e pH por meio das diversas atividades humanas (agrícolas, urbano-industriais e energético-mineradoras) o que é comum, principalmente em bacias mais antropizadas (FRITZONS et al., 2009).

Tabela 13 - Efeito da mudança de faixa de pH sobre emulsificação do BSP.

Linhagens bacterianas	Variação de pH		
	2	6	9
<i>Bacillus cereus</i> 1-L1M3	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas spp.</i> 2-L3M6	100%	100%	100%
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3-L1L11	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas spp.</i> 4-L1L15	100%	100%	100%
<i>Serratia odorifera</i> 5-L2L3	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 6-L1P3	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas cepacea</i> 7-L1P4	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 8-L3F4	100%	100%	100%
<i>Staphylococcus spp.</i> 9-L4F6	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 10-L6F6	100%	100%	100%

Legenda: (%) porcentagem de emulsificação em triplicata.

Fonte: Autoria própria 2013.

5.4.3 Estudo de estabilidade térmica

Avaliando os efeitos do tratamento térmico em diversos intervalos de tempo e temperaturas (80, 100 e 120°C) é possível observar que todos mantiveram a capacidade de emulsificação, mostrando uma propriedade de termoestabilidade dos BSP testados (Tabela 14). As análises de Felix et al., (2012) mostram resultados obtidos quando foram estudados os efeitos da exposição à temperatura de 100 °C em pequenos espaços de tempo, até 60 minutos, observou-se pequena variação da tensão superficial e em tempos de exposição superiores a 1 hora diminuíram a estabilidade do surfactante porém, em valores aceitáveis. Rocha et al., (2007) também observaram que não houve diferença significativa, com 95% de confiança, entre os valores de tensão superficial ao longo do tempo de exposição a diferentes temperaturas. A estabilidade do biossurfactante quando submetido a elevadas

temperaturas por curtos períodos de tempo, em sua maioria utilizada em processos de esterilização, leva a indicar sua utilização em indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos, indústrias onde o aquecimento para se atingir a esterilidade é de primordial importância (KHOPADE et al., 2012).

Tabela 14 - Efeito do tempo de exposição do BSP em diferentes temperaturas e tempos.

Linhagens bacterianas	80°C			100°C			121°C		
	15 min.	30 min.	60 min.	15 min.	30 min.	60 min.	15 min.	30 min.	60 min.
<i>Bacillus cereus</i> 1-L1M3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas spp.</i> 2-L3M6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Bacillus thuringiensis</i> 3-L1L11	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas spp.</i> 4-L1L15	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Serratia odorifera</i> 5-L2L3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 6-L1P3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Pseudomonas cepacea</i> 7-L1P4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 8-L3F4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Staphylococcus spp.</i> 9-L4F6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Xanthomonas maltophilia</i> 10-L6F6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Legenda: (%) porcentagem de emulsificação em triplicata

Fonte: Autoria própria 2013

5.5 Resultado dos testes de avaliação da determinação da CMC

Medeiros (2007) afirma que o índice utilizado para avaliar a eficiência de um surfactante é a redução da tensão superficial e a concentração micelar crítica (CMC).

Segundo Rizzatti (2003) em baixas concentrações, os monômeros de surfactantes encontram-se em equilíbrio em solução e adsorvidos nas interfaces. Com o aumento da concentração, a adsorção aumenta formando monocamada de surfactante, saturando a superfície da solução. Neste ponto, a adição de surfactantes provoca agregação da parte hidrofóbica das moléculas de surfactantes resultando em micelas, agregados de 50 ou mais monômeros, que adotam a forma esférica (Figura 2).

Acima da CMC não existe um aumento significativo no número de monômeros isolados e, conseqüentemente, a força de coesão das moléculas da superfície é pouco modificada, não se observando efeitos significativos sobre a tensão superficial da solução (RIZZATTI et al., 2009).

No presente experimento, inicialmente foi determinada a CMC dos dez BSP através do método tensiométrico. Utilizou-se solução aquosa (pH 6,5) e solução tampão (PBS pH 7,0), como mostra a Tabela 15. Observou-se que nos resultados obtidos com a solução tampão, houve uma diminuição do CMC quando comparadas com a solução aquosa. Isso ocorre devido à presença de sal, uma vez que os íons do sal neutralizam as cargas na superfície da micela, diminuindo a atmosfera iônica ao redor da cabeça iônica do tensoativo e a repulsão eletrostática entre eles (MORAES; REZENDE, 2004).

Ron e Rosenberg (2002) afirmam que a eficiência de um surfactante é medida através da CMC. Esta pode variar de 1 a 2000 mg/L, determinando uma característica básica e essencial de eficiência e efetividade do mesmo. Já Mulligan e Gibbs, (1993) afirmam que a CMC dos biossurfactantes mais eficazes varia entre 1 e 200mg.L⁻¹. Nesse trabalho os BSP obtidos e testados apresentaram um CMC entre 5,0 a 32,3 mg/mL, demonstrando uma variada eficiência e capacidade de redução da tensão superficial.

Em trabalhos realizados por Santana Filho (2009), com ramnolipídeos produzidos por linhagens *P. aeruginosa* UFPEDA 614, obtiveram-se em tempos que variam de 24 horas até nove dias de cultivo os seguintes CMC: 15,6 mg/L, 28,4 mg/L, 30,0 mg/L, 30,3 mg/L e 31,2 mg/L. Esses valores se assemelham com os encontrados no presente trabalho, conforme mostra a Tabela 15.

O valor baixo de CMC encontrado no experimento mostra o grau de eficiência dos BSP estudados e também revela ser menor que o relatado na literatura, quando comparados com os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*, os quais apresentam um CMC de 48,3 mg.L⁻¹ (CAMILIOS NETO et al., 2008).

Tomando como base a menor CMC encontrada nesse estudo, esta ainda se mostrou inferior a CMC do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, descrito por Vaz et al. (2012), considerando o valor encontrado de 40 mg.L⁻¹, em seu trabalho desenvolvido.

Ao comparar o CMC do BSP (7-L1P4) com um surfactante químico: o dodecil sulfato de sódio (SDS), surfactante químico comumente utilizado na indústria, o qual

apresenta um CMC de 2,333 mg·mL (TAVARES, 1997), podemos observar que seu CMC é entorno de 2 vezes menor que o estudado. Tais constatações nos permitem inferir com clareza a importância de mais pesquisas e do aprimoramento da produção de biossurfactante.

Tabela 15 - Valores do CMC determinados pelo método tensiométrico dos BSP em solução aquosa e solução tampão

BSP	CMC (mg/mL)	
	Sol. aquosa pH 6,5	Sol. Tampão PBS pH 7,0
1-L1M3	15,5	16
2-L3M6	28,4	27
3-L1L11	30,0	25
4-L1L15	30,3	29
5-L2L3	31,2	24
6-L1P3	18,6	13
7-L1P4	5,03	4,9
8-L3F4	9,2	8,0
9-L4F6	6,0	5,9
10-L6F6	32,3	28,0

Fonte: Autoria própria 2013

Os valores da CMC verificados pelo método da espectroscopia de absorção visível, onde se utilizou o corante Sudam III, foram determinados pelas mudanças de comportamento na curva de absorção. Essa mudança de comportamento ocorre, por sua vez, devido à modificação no ambiente em que essas moléculas se encontram. Aumentando-se a concentração de BSP há formação de micelas e, com isso, ocorre à incorporação do corante na micela, até um ponto onde o corante está totalmente solubilizado na micela, obtendo-se, assim, o ponto máximo da curva. O ponto máximo representa o valor da CMC (MORAES; REZENDE, 2004).

Os três BSP que tiveram o menor valor do CMC, entre dez escolhidos para a sequência de testes, tiveram sua origem de linhagens bacterianas originados de solos comprometidos (ferro velho e posto de combustível).

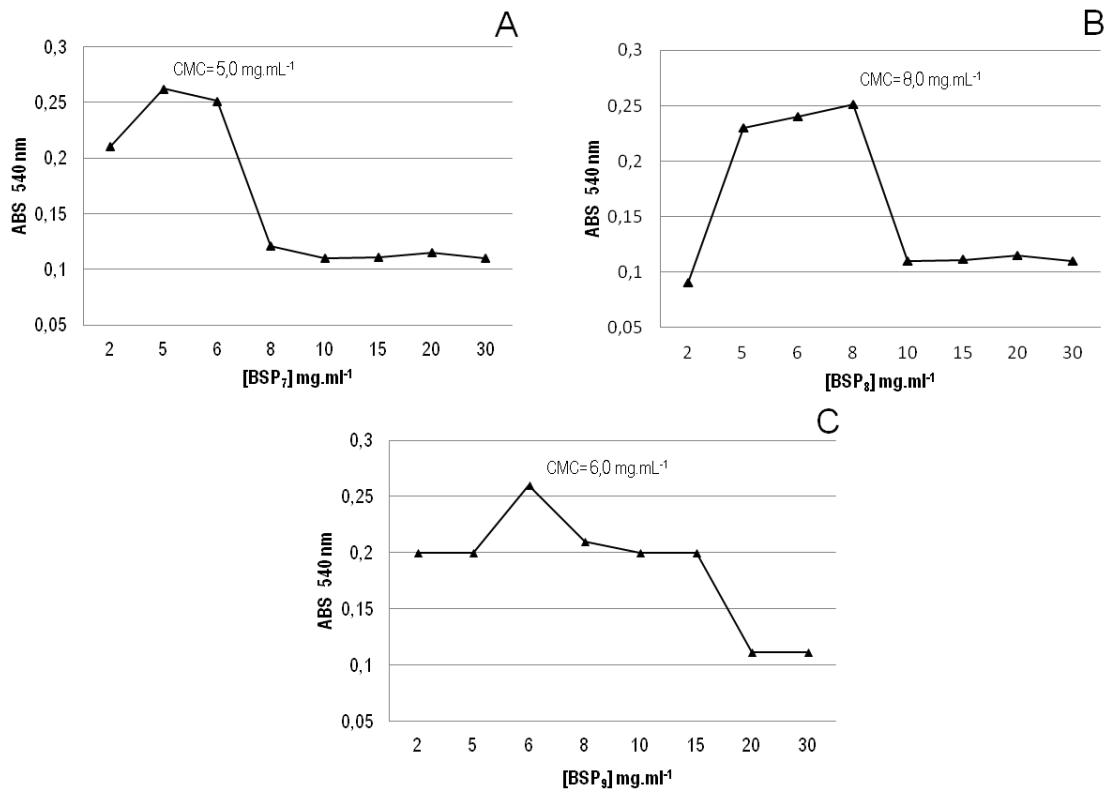
A tabela 16 mostra os valores do CMC, obtidos pelo método tensiométrico, os quais foram confirmados pelo método espectroscopia de absorção visível (Tabela 16 e Figura 12). Os valores das CMC destes BSP foram menores que a relatada na literatura, como os resultados encontrados por Costa (2005), onde o biossurfactante, produzido por *Bacillus subtilis*, apresentou um valor do CMC igual a 10 mg/L e por Nitschke *et al.* (2004) (11 mg/L). Barros *et al.* (2008) também encontraram valores parecido de CMC de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* igual 12 mg/l. Estes valor são elevados quando comparados ao obtidos no presente trabalho.

Tabela 16 - Valores de CMC determinados pelo método espectrométrico dos BSP em solução aquosa de corante sudan III.

BSP	ABS (Vis-504 nm)	CMC mg/mL
7-L1P4	0,262	5,0
8-L3F4	0,251	8,0
9-L4F6	0,260	6,0

Fonte: Autoria própria 2013

Figura 12 - Medidas de absorvância para diferentes concentrações de BSP utilizando o corante sudan III (504nm).



Legenda: (A) BSP7 seu CMC foi de 5,0 mg/mL; (B) BSP8 seu CMC foi de 8,0 mg/mL; (C) BSP9 seu CMC foi de 6,0 mg/mL.

Fonte: Autoria própria 2013

5.6 Remoção de cátions metálicos (Ni, Mn e Cr).

Para dar sequência aos testes experimentais para a remoção de cátions metálicos foram escolhidos três BSP que tiveram o menor valor do CMC, cujos quais, também, apresentaram maiores índices de UA μ /ml. Duas são procedentes de solos de ferros-velhos (8-L3F4 e 9-L4F6) e a terceira é procedente de posto de combustível (7-L1P4) como mostra a Tabela17.

Tabela 17 - Identificação das linhagens bacterianas dos BSP utilizados na remoção de cátions metálicos com suas respectivas unidades arbitrária.

Linhagens	Identificação bacterianas	(UA ϵ /ml)	CMC (mg/mL) ** Sol. aquosa pH 6,5
2*-BSP8	<i>Xanthomonas maltophilia</i> 8-L3F4	320 UA ϵ /ml ⁻¹	9,2
3*-BSP9	<i>Staphylococcus spp.</i> 9-L4F6	320 UA ϵ /ml ⁻¹	6,0
4*-BSP7	<i>Pseudomonas cepacea</i> 7-L1P4	1280 UA ϵ /ml ⁻¹	5,03

*numeração das linhagens bacterianas enviadas para laboratório de acordo com os laudos em Anexo.**valores discutidos no item 5.6.

Fonte: Autoria própria 2013

A concentração inicial da solução de cátions metálicos (Cr, Mn e Ni), analisadas continham 30 ppm de cada metal. A média final da capacidade de remoção dos cátions metálicos, após a adição dos BSP, foi expressiva, chegando quase 100% de redução, como mostra a Tabela 18. Essa eficiência fica mais clara quando os valores são dados em percentual de remoção (Tabela 19).

Tabela 18 - Média e desvio padrão das concentrações de cátions metálicos não removidos após aplicação dos BSP.

Linhagens	Cr	Mn	Ni
BSP7	0,814 \pm 0,026	0,358 \pm 0,0646	0,81 \pm 0,015
BSP8	0,218 \pm 0,01708	0,902 \pm 0,188	0,18 \pm 0,03328
BSP9	0,260 \pm 0,0404	0,238 \pm 0,0822	0,264 \pm 0,0682

A concentração dos metais (ppm) foram medidas e representada como média \pm desvio padrão.

Fonte: Autoria própria 2013

Tabela 19 - Valores percentuais e absolutos do efeito complexante dos BSP testados.

Linhagens	Cr	Mn	Ni
BSP7	97,3% (29,186)*	98,8% (29,642)*	97,3% (29,19)*
BSP8	99,3% (29,782)*	96,9% (29,098)*	99,4% (29,82)*
BSP9	99,1% (29,74)*	99,2% (29,762)*	99,1% (29,736)*

*valores das concentrações estão representados em ppm.

Fonte: Autoria própria 2013

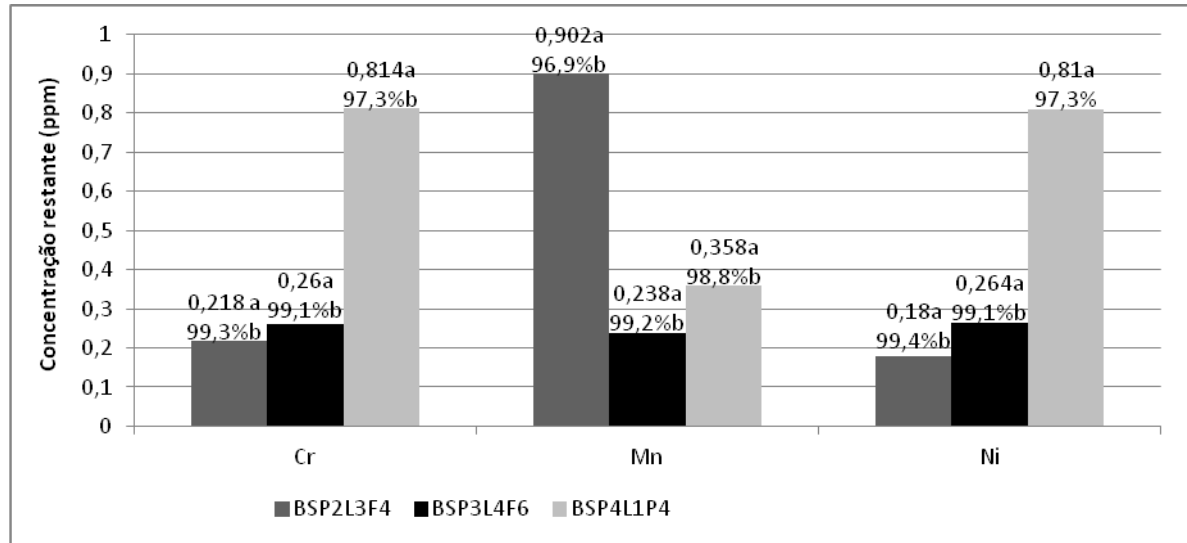
Neste estudo de remoção de cátions metálicos, o Cr e o Ni foram os cátions metálicos mais removidos nestas soluções. Ambas as linhagens produtoras de biossurfactante (BSP8 e BSP9) removeram mais de 99 % de Cr, sendo que a linhagem BSP7 removeu 97,3% do mesmo cátion metálico. Nas pesquisas de Benetazzo e Júnior (2011) a remoção do Cr, utilizando o biossurfactante surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis*, foi $\leq 40\%$, mesmo assim, segundo os pesquisadores, foi considerado um resultado positivo. Por sua vez, Avramović et al, (2013) tiveram melhor resultado utilizando o biossurfactante produzido por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, o qual apresentou um resultado $\geq 57\%$ na remoção de Cr.

Das linhagens estudadas que apresentaram menor desempenho na redução de cátions metálicos (Cr, Mn e Ni) a linhagem BSP7 apresentou menor eficiência para todos os cátions metálicos ($\leq 98,8\%$), Wang e Mulligan (2004) utilizaram uma espuma de biossurfactante em solo arenoso e obtiveram uma remoção de 68% de Ni, os mesmos autores investigaram e compararam, também, a eficiência da remoção de espuma gerada por um surfactante químico (Triton X-100), que neste caso, removeu 57,3% de Ni, nas mesmas condições.

Entre as demais linhagens produtoras de biossurfactantes a BSP9 apresentou uma redução de 99% na concentração dos mesmos cátions metálicos (Cr, Mn e Ni), sendo entre eles o Mn o cátion metálico que teve maior remoção (99,2%). De acordo com Mullian (2005), os biossurfactantes podem ser usados para remover metais de sistemas, devido à sua capacidade de complexação. Sua composição complexa apresenta sítios de ligação potenciais para o sequestro de íons metálicos. Segundo Miller (1995) os biossurfactantes apresentam potencial para aumentar as eficiências de remoção de metais em solos por facilitarem processos de sorção, transferência de massa e resistência ao transporte em fase aquosa. A adição de biossurfactante pode promover a desorção de metais pesados de fases sólidas através da complexação das formas livres dos metais em solução ou pela acumulação dos biossurfactantes na interface líquido-sólido causada pela redução das atividades interfaciais, o que promove um contato direto entre os biossurfactantes e os metais.

Os resultados dos testes de remoção de cátions metálicos bem como seus percentuais estão ilustrados na Figura 13.

Figura 13 - Eficiência de remoção dos metais em solução, após aplicação dos BSP.



Legenda: (a) valor em ppm da concentração do metal na solução; (b) valor percentual de redução do metal na solução; (concentração inicial dos metais: 30 ppm).

Fonte: Autoria própria 2013.

Segundo Mulligan et al, (2001) surfactantes microbianos são considerados substâncias efetivas no tratamento de metais, pois se sabe que a qualidade da emulsão proporciona um decréscimo na condutividade do meio, pelo aumento da viscosidade. Isto por sua vez interfere diretamente na mobilidade dos íons metálicos. Avaliando os BSPs testados e sua capacidade de remoção de metais neste experimento, todos tiveram um IE \geq 50% (Tabela 9). Reafirmando o que já foi descrito por Bento (2008), um microrganismo bom produtor de biosurfactante deve apresentar uma emulsificação estável por no mínimo 24 h, tolerando-se uma redução máxima de 50%, desta estabilidade, no decorrer do tempo.

5.7 Aplicações

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os BSP testados são muito eficientes possibilitando a aplicação em praticamente todos os setores industriais, pois sua natureza anfipática confere a eles a propriedade de formar microemulsões, possibilitando a solubilização de compostos hidrofóbicos em água. Assim sendo, sua aplicação pode ser diversa, tais como emulsificantes em indústrias de alimentos e de cosméticos, componente de produtos domésticos e indústria de limpeza, aditivos na indústria de construção civil e petróleo (SALAGER, 2002). Sua compatibilidade ecológica faz com que sejam especialmente apropriados para o uso

em processos que envolvem a dispersão de surfactantes no meio-ambiente, tais como a biorremediação de solos e aquíferos contaminados por compostos recalcitrantes hidrofóbicos (BONILLA et al., 2005) em recuperação melhorada de petróleo (MEOR).

Os BSP testados nesse estudo demonstraram uma grande eficiência na remoção (complexação) de metais de solos contaminados, apresentando potencial para aumentar a eficiência de remoção de metais em solos por facilitarem processos de sorção, transferência de massa e resistência de transporte em fase aquosa. A adição de biossurfactantes pode promover a dessorção de metais pesados de fases sólidas através da complexação das formas livres dos metais em solução ou pela acumulação dos biossurfactantes na interface líquido-sólida causada pela redução das atividades interfaciais, o que promove um contato direto entre os biossurfactantes e os metais (MILLER, 1995).

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, apresentados e discutidos no decorrer do presente trabalho, pode-se concluir que os microrganismos isolados nas áreas contaminadas, escolhidas para pesquisa, apresentam capacidade de produzir biossurfactante. Assim foram isoladas 106 linhagens bacterianas, das quais 101, produziram surfactantes e destas, 77 mantiveram a emulsificação estável por mais de 7 dias.

A melhor produção de biossurfactantes foi obtida por dez linhagens bacterianas, as quais apresentaram um IE% de $\geq 50\%$, que foram: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus thuringiensis*, *Serratia odoifera*, *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas cepacea*, *Staphylococcus spp.*

A habilidade de emulsificação das dez linhagens bacterianas foi verificada em altas temperaturas, em pHs ácido e básico e em diferentes concentrações de NaCl, portanto os biossurfactantes produzidos apresentaram propriedades de termorresistência, acidobásico-resistência e serem halofílicos.

Os BSP obtidos e testados apresentaram uma CMC entre 5,0 a 32,3 mg/mL, demonstrando sua eficiência e capacidade de redução da tensão superficial. Os três principais biossurfactantes testados foram produzidos pelas bactérias 7-L1P4 (*P. cepacea*), 8-L3F4 (*X. maltophilia*) e 9-L4F6 (*Staphylococcus spp.*). Esses apresentaram uma CMC igual a 5,0, 8,0 e 6,0 mg/mL, respectivamente.

As três linhagens bacterianas produtoras de biossurfactante (7-L1P4, 8-L3F4 e 9-L4F6) e testadas para a remoção de metais, mostraram-se eficientes frente à remoção de Ni, Mn e Cr fortalecendo a sua possibilidade de uso na biorremediação.

7. PERSPECTIVAS

- Novos trabalho deverão ser desenvolvidos com o objetivo de otimizar uma metodologia para a produção desses biossurfactantes em maior escala e com baixo custo operacional. Assim também novas metodologias devem ser desenvolvidas para melhorar o processo de extração e purificação dos biossurfactantes.
- Neste mesmo parâmetro faz-se necessário desenvolver estudos da viabilidade de aplicação.
- Na continuidade da pesquisa deverão ser feitos estudos avançados na questão da caracterização química e a possibilidade de síntese industrial.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. Z. A biorremediação como ferramenta para minimização de problemas ambientais. **Curso de especialização em gerenciamento ambiental. Monografia. ESALQ. Piracicaba. SP.**, 2003.
- AgroLab - Laboratórios de Fitopatologia e Nematologia.** , setembro. 2012. Disponível em: <[http:// www.acrolab.com.br](http://www.acrolab.com.br)>
- AL-ARAJI, L.; RAHMAN R. N. Z. R. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. Microbial Surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, p. 99 –105, 2007.
- AŞÇI, Y.; NURBAŞ, M.; AÇIKEL, Y. S. A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1–3, p. 663–673, 15 jun. 2008.
- AVRAMOVIĆ, N. S.; NIKOLIĆ-MANDIĆ, S. D.; KARADŽIĆ, I. M. Influence of rhamnolipids, produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P), B001380 on Cr (VI) removal capacity in liquid medium. **Journal of the Serbian Chemical Society**, p. 115–115, 2013.
- BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **J Chem Technol Biotechnol**, p. 723–736, 2005.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 1 maio. 2000.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSCA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409 – 414, 2007.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979–985, 2008.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. DE; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, p. 979–985, 2008.
- BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3. ed. [s.l.] Cambridge: Cambridge University, 1993.
- BENETAZZO, N. K.; JÚNIOR, A. E. Produção e aplicações de biossurfactantes e hidrolisados protéicos para descontaminação ambiental. **Anais do XVI Encontro de**

Iniciação Científica e Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da PUC-Campinas, setembro. 2011.

BENTO, F.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 65–68, 2003.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Biossurfactantes. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúnam-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 151 –184.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Braz J Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 231– 236, 1999.

Biorremediação - na senda da sustentabilidade. , 2013. Disponível em: <<http://biorremediacao-sustentabilidade.blogspot.com.br>>. Acesso em: 27 mar. 2013

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Biosurfactants: Types, Screening Methods, and Applications. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2002. p. 750–770.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1–2, p. 41–52, 15 jul. 1999.

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 456–463, 1 fev. 2005.

BORIN, A.; POPPI, R. J. Multivariate quality control of lubricating oils using Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 570 – 576, 2004.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1935–1943, 1996.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. Tese - Doutorado.—São José do Rio Preto - SP: Univesidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho., 2008.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização**. Dissertação - Mestrado.—Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Química., 2009.

CAMILIOS NETO, Doumit.; MAIRA, Joel A.; ARAÚJO, Janete M.; MITCHELL, David A.; KRIEGER, Nadia. Optimization of the production of rhamnolipids by

Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 441–448, 1 dez. 2008.

CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. B. M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R. V. ALQUERES, S. M. C.; ALMEIDA, W. I. Archaea: Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, v. VI, n. 30, p. 71 – 77, 2003.

CAVALERO, D. A.; COOPER, D. G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 31–41, 12 jun. 2003.

CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE. **Manual para apresentação de trabalhos acadêmicos do Centro Universitário La Salle**. 3. ed. 2011. Disponível em: <https://academicos.unilasalle.edu.br/docs/manual_trab_academicos_2011.pdf> Acesso em: 12 ago. 2013

CHRISTIE, W. W. **Rhamnolipids, sophorolipids and other glycolipids biosurfactants.**, 2013. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/rhamno/index.htm>>

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **VETOR - Revista de Ciências Exatas e Engenharias - Rio Grande**, n. 13, p. 85 – 103, 2003.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus species*. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 221 –229, 1987.

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. **Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**, p. 87, 2005.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnologica de surfatante de Bacillus subtilis em residuo agroindustrial, caracterização e aplicações.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos).—Campinas, SP: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

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

DIEMER, F.; APECHT, L. P.; LAUTENSCHLAGER, C. E.; CONSOLI, N. C. Estudo da permeabilidade do solo da região de Ijuí-RS percolando água e óleo diesel A study of the permeability soil percolating water and oil in the region of Ijuí-RS. **Teoria e Prática na Engenharia Civil**, n. 16, p. 29–41, 2010.

EKANEM, E. J.; LORI, J. A.; THOMAS, S. A. The determination of wear metals in used lubricating oils by flame atomic absorption spectrometry using sulphanyllic acid as ashing agent. **In Honour of Professor George-Emil Baiulescu**, v. 44, n. 11, p. 2103–2108, nov. 1997.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. Dissertação—Fortaleza - CE: Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química., 2012.

FELIX, A. K. N.; CALVALCANTE, K. N.; FRANÇA, I. W. F.; OLIVEIRA, D. W. F.; MELO, V. M. M.; SANTANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B.; SANTIAGO-AGUAR, R. S. Estabilidade e propriedade emulsificante da surfactina *Bacillus subtilis* LAMI005. **COBEC 2012 - XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Búzios - RJ**, 2012.

FRITZONS, E.; MANTOVANI, L. E.; NETO, A. C.; HINDI, E. C. A influência das atividades mineradoras na alteração do pH e da alcalinidade em águas fluviais: o exemplo do rio Capivari, região do carste paranaense. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n. 3, p. 381–390, 2009.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos de biorremediação de xenobióticos. **Revista Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, v. VIII, n. 34, p. 36–43, jun. 2005.

GUTNICK, D. L.; AVIGAD, R.; BLATT, Y.; MINAS, W.; ALLON, R. Amphipathic microbial capsules as industrial products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 74, p. 125S–135S, 1 jun. 1993.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 6, n. 2, p. 148–159, 2001.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciências Rural**, v. 40, n. 2, p. 280–287, 2010.

KÄPPELI, O.; FINNERTY, W. R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 707–712, 1979.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311–318, 1 fev. 2012.

KIMURA, H.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Novel Bacteriocin of *Pediococcus sp.* ISK-1 Isolated from Well-Aged Bed of Fermented Rice Bran. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 864, n. 1, p. 345–348, 1998.

KITAMOTO, Dai.; MORITA, Tomotake.; FUKUOKA, Tokuma.; KONISHI, Masa-aki.; IMURA, Tomohiro. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 315–328, out. 2009.

KONEMAN, E. W.; WILLIAN, M. J.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; WOODS, G. L. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil biorremediation. **Food Technology and Biotechnology**, p. 295 – 304, 2001.

KREPSKY, N.; SOBRINHO, F. S.; CRAPEZ, A. C. Biodetergentes para limpeza de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 38, n. 223, p. 70 – 73, 2006.

KURTBÖKE, D. I.; SWINGS, J. **Microbial genetic resources and biodiscovery / edited by Ipek Kurtboke and Jean Swings**. Egham, Surrey: World Federation of Culture Collections, 2004.

LIU, Q.; DONG, G.; ZHOU, W.; AYUB, M.; ZHANG, Y. P.; HUANG, S. Improved oil recovery by adsorption–desorption in chemical flooding. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 43, n. 1–2, p. 75–86, jun. 2004.

MACIEL, C. C. S.; TAKAKI, G. M. C.; GUSMÃO, N. B. Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. **Revista Eletrônica de Biologia ISSN 1983-7682**, v. 3, n. 1, p. 58–64, 2010.

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101–121, 2003.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625–633, 1 nov. 2000.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428–434, 1 mar. 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p. 37 –42, 1997.

MARQUEZ, A. M.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F. J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A.; MANZERA, A.; ESPUNY, M. J. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 158, n. 2, p. 110–117, abr. 2009.

MASLIN, P.; MAIER, R. M. Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene in organic-metal co-contaminated soils. **Bioremediation Journal**, v. 04, n. 04, p. 295–308, 2000.

MEDEIROS, S. I. G. **Síntese enzimática de biosurfactante e sua aplicabilidade na indústria do petróleo**. Dissertação (Mestrado em Química).—Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Centro de Ciências Exatas da Terra., 2007.

MIGUEL, R., B. **Hidrocarbonetos - Os hidrocarbonetos naturais são compostos químicos constituídos apenas por átomo de carbono (C) e de hidrogênio (H).** **A Graça da Química**, outubro. 2008. Disponível em: <<http://www.agracadaquimica.com.br/quimica/arealegal/outros/85.pdf>>. Acesso em: 3 jun. 2013

MILLER, R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. Suppl 1, p. 59, 1995.

MORAES, S. L. DE; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Química Nova**, v. 27, p. 701–705, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. [s.l.] UFLA, 2006.

MULLIAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, jan. 2005.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: **Biosurfactants: production, properties and applications**. New York: N. Kosaric, 1993. p. 329–372.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings-indian National Science Academy Part B**, v. 70, n. 1, p. 31–56, 2004.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. **Environmental Progress**, p. 31 – 35, 1999.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil. **Engineering Geology**, p. 371 – 380, 2001.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Contaminated Dredged Soils**, v. 85, n. 1–2, p. 111–125, 30 jul. 2001.

NITSCHKE, Marcia.; HADDAD, Renato.; COSTA, Gisele N.; GILIOLI, Rovilson.; MEURER, Eduardo C.; VICCARI GATTI, Maria S.; EBERLIN, Marcos N.; HOEHR, Nelci F.; PASTORE Glauca M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591–596, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772–776, 2002.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. Tese - Doutorado.—Jaboticabal - SP:

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,, 2009.

PEIXOTO, R. M. **Bioprospecção de microorganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes**. Dissertação (Mestrado de Microbiologia).—São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro - SP: Instituto de Biociências-Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2006.

RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L. Emprego de biorreator não convencional no tratamento de solo contaminado por petróleo. 2004.

RESER, J.; KOCH, A.K.; JENNY. K.; KAPPELI, O. **Advances in Applied Biotechnology Series**. Gulf Publishing Company: Londres.1989, cap. 3.

RIZZATTI, I. M. **Construção de eletrodos de membrana seletiva para surfactante e eletrodos para brometo para aplicação em estudo potenciométrico de interações entre dodecilsulfato de sódio e polióxido etileno**. Dissertação - Mestrado.—Florianópolis - SC: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-graduação em Química, 2003.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, p. 518–521, 2009.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO, M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. **ABPG-PDPETRO, 4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás. UNICAMP , SP., 2007.**

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249–252, 1 jun. 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154–162, 1999.

ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melão e manipueira**. Viçosa -MG: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2008.

SALAGER, J.-L. Surfactant's types and uses. **Fire p booket-E300-attaching aid in surfactant science and engineering in English. Merida Venezuela**, v. 2, p. 3, 2002.

SANTANA FILHO, A. . P. **Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614: Estudos de produção e de variação da composição de homólogos.** Curitiba - PR: Universidade Federal do Paraná., 2009.

SCHIMEL. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. **Ecol. Stud.**, p. 239 –254, 1998.

SEABRA, P. N. C. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo. **Tese (Programa de Pós-Graduação de Engenharia) Universidade Federal do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro., 2005.

SHARMA, H. D.; REDDY, K. R. **Geoenvironmental Engineering: Site remediation, Waste containment, and Emerging Waste Management Tchnologies.** [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2004.

SILVA, C. S.; JÚNIOR, A. E. Remediação de águas contaminadas com metais utilizando biossurfactantes. **Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica – Anais do II Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. PUC -Campinas.**, 2012.

SILVA, Marco. A. P.; SANTOS, Priscila A. dos.; LEÃO, Karen M.; NICOLAU, Edmar S.; OLIVEIRA, Antônio de O. **Provas bioquímicas para identificação de *Listeria innocua* em alimentos:** Revisão bibliográfica. **PUBVET - Londrina.** v. 4, n. 120, 2010.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, jan. 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142–146, 1 mar. 2004.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 2, p. 291–297, 25 jun. 2004.

SPROCATI, A. R.; ALISI, C.; SEGRE, L.; TASSO, F.; GALLETI, M.; CREMISINI, C. Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. **Science of The Total Environment**, v. 366, n. 2–3, p. 649–658, 1 ago. 2006.

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 56, n. 3, p. 776 – 781, 1990.

VAN HAMME, J. D.; 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, n. 6, p. 604–620, nov. 2006.

VAZ, Deisi A.; GUDINÃ, Eduardo J.; ALAMEDA, Encarnación J.; TEIXEIRA, José A.; RODRIGUES, LÍgia R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, n. 0, p. 167–174, 1 jan. 2012.

VIRAMONTES-RAMOS, S.; PORTILLO-RUIZ, M. C.; BALLINAS-CASARRUMAS, M.L.; TORRES-MUÑOS, J. V.; RIVERA-CHAVIRA, B. E.; NEVÁRES-MOORILLÓN, G. V. Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarboncontaminated Soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 668 – 675, 2010.

WANG, S.; MULLIGAN, C. Rhamnolipid Foam Enhanced Remediation of Cadmium and Nickel Contaminated Soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 157, n. 1-4, p. 315–330, 1 set. 2004.

YAMASOE, M. A.; ARTAXO, P.; MIGUEL, A. H.; ALLEN, A. G. Chemical composition of aerosol particles from direct emissions of vegetation fires in the Amazon Basin: water-soluble species and trace elements. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 10, p. 1641–1653, 2000.

ZANONI, C. D. C. A.; BOLLMANN, H. A. Mapeamento e avaliação da qualidade das águas dos olhos d'água e nascentes na bacia do rio belém: Sub-Bacia da Barreirinha. **XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos - São Paulo**, 2007.

ZHANG, D.; WANG, J.; PAN, X. Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 138, n. 3, p. 589–593, 1 dez. 2006.

ZHOU, M.; RHUE, R. D. Screening commercial surfactants suitable for remediating DNAPL source zones by solubilization. **Environmental science & technology**, v. 34, n. 10, p. 1985–1990, 2000.

APÊNDICE A - Índice de Emulsificação (IE) das 106 linhagens isoladas.

Nº total de linhagens	AMOSTRA	T0	T24	TS ₇
1	L1M1	0	0	0
2	L1M2	18%	9%	9%
3	L1M3	54,50%	50,90%	45,50%
4	L1M4	0	0	0
5	L2M1	36,40%	30,90%	0
6	L2M2	45,40%	40,90%	40,90%
7	L2M3	49,10%	43,60%	43,60%
8	L2M4	45,40%	40%	40%
9	L2M5	45,40%	41,80%	41,80%
10	L2M6	45,40%	43,60%	41,80%
11	L2M7	45,40%	45,40%	45,40%
12	L2M8	38,20%	18,20%	0
13	L3M1	36,40%	36,40%	36,40%
14	L3M2	45,40%	40%	40%
15	L3M3	36,40%	36,40%	36,40%
16	L3M4	45,40%	40%	36,40%
17	L3M5	36,40%	36,40%	36,40%
18	L3M6	54,50%	45,40%	45,40%
19	L4M1	52,70%	47,30%	45,40%
20	L4M2	45,40%	40%	40%
21	L4M3	41,80%	34,50%	18,20%
22	L4M4	36,40%	27,30%	5,50%
23	L4M5	49%	47,30%	45,40%
24	L4M6	52,70%	45,40%	45,40%
25	L1L2	54,50%	50,90%	45,40%
26	L1L3	54,50%	50,90%	47,30%
27	L1L5	52,70%	47,30%	47,30%
28	L1L6	54,50%	47,30%	47,30%
29	L1L7	32,70%	27,30%	27,30%
30	L1L9	52,70%	52,70%	47,30%
31	L1L10	54,50%	50,90%	47,30%
32	L1L11	56,40%	52,70%	49,10%
33	L1L13	50,90%	45,40%	41,80%
34	L1L14	52,70%	47,30%	47,30%
35	L1L15	54,50%	49,10%	49,10%
36	L2L1	54,50%	9,15	0
37	L2L2	45,40%	0	0
38	L2L3	45,40%	45,40%	45,40%
39	L2L1	54,50%	9,15	0
40	L2L2	45,40%	0	0
41	L2L3	45,40%	45,40%	45,40%
42	L1P1	52,70%	43,60%	38,20%
43	L1P2	54,50%	45,40%	45,40%
44	L1P3	54,50%	47,30%	47,30%
45	L1P4	54,50%	50,90%	49,10%
46	L1P5	45,40%	45,40%	40%
47	L1P6	54,50%	45,40%	36,40%
48	L1P7	52,70%	38,20%	40%
49	REFAP1	36,40%	0	0
50	REFAP2	36,40%	29,10%	0
51	REFAP3	36,40%	36,40%	36,40%
52	REFAP4	21,80%	0	0
53	REFAP5	21,80%	0	0

Nº total de linhagens	A MOSTRA	T ₀	T ₂₄	TS ₇
54	REFAP6	erro	erro	erro
55	REFAP7	40%	38,20%	38,20%
56	REFAP8	45,40%	43,60%	40%
57	REFAP9	43,60%	40%	40%
58	L1F1	47,30%	45,40%	45,40%
59	L1F4	36,40%	36,40%	36,40%
60	L1F8	0	0	0
61	L1F12	52,70%	47,30%	47,30%
62	L2F1	45,40%	36,40%	9,10%
63	L2F2	36,40%	36,40%	27,30%
64	L2F3	47,30%	45,40%	45,40%
65	L2F4	36,40%	0	0
66	L2F5	54,50%	47,30%	45,40%
67	L2F6	45,40%	30,90%	9,10%
68	L2F7	49,10%	45,40%	45,40%
69	L2F8	43,60%	27,30%	27,30%
70	L3F1	43,60%	47,30%	45,40%
71	L3F2	36,40%	45,40%	45,40%
72	L3F3	49,10%	49,10%	49,10%
73	L3F4	54,50%	49,10%	49,10%
74	L3F5	52,70%	40%	30,90%
75	L3F6	54,50%	49,10%	45,40%
76	L3F7	54,50%	41,80%	36,40%
77	L3F8	47,30%	45,40%	45,40%
78	L4F1	43,60%	36,40%	18,20%
79	L4F2	36,40%	36,40%	36,40%
80	L4F3	52,70%	45,40%	45,40%
81	L4F4	52,70%	49,10%	45,40%
82	L4F5	54,50%	50,90%	45,40%
83	L4F6	56,70%	54,50%	49,10%
84	L4F7	54,50%	45,40%	43,60%
85	L4F8	43,60%	18,20%	0
86	L5F1	49,10%	45,40%	45,40%
87	L5F2	49,10%	45,40%	45,40%
88	L5F3	45,40%	47,30%	36,40%
89	L5F4	52,70%	45,40%	41,80%
90	L6F1	52,70%	45,40%	45,40%
91	L6F2	52,70%	47,30%	45,40%
92	L6F3	52,70%	45,40%	41,80%
93	L6F4	52,70%	49,10%	49,10%
94	L6F5	50,90%	45,40%	45,40%
95	L6F6	54,50%	50,90%	49,10%
96	L6F7	52,70%	50,90%	45,40%
97	L6F8	47,30%	45,40%	45,40%
98	L7F1	43,60%	36,40%	30,90%
99	L7F2	45,40%	41,80%	36,40%
100	L7F3	47,30%	40%	40%
101	L7F4	47,30%	45,40%	45,40%
102	L7F5	45,40%	40%	38,20%
103	L7F6	45,40%	41,80%	40%
104	L7F7	36,40%	32,70%	27,30%
105	L7F8	38,20%	29,10%	27,30%
106	L7F9	45,40%	41,80%	30,90%

Oficina Mecânica
 Posto de Lavagem
 Posto de Combustível
 Refinaria Alberto Pasqualini
 Ferro-velho

APÊNDICE B - Resultados das provas bioquímicas usadas na identificação das bactérias selecionadas.

TESTES	LINHAGEM																			
	L1M3		L3M6		L1L11		L1L15		L2L3		L1P3		L1P4		L3F4		L4F6		L6F6	
MEIO TSI																				
BASE AMARELA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
BASE VERMELHA																				
ÁPICE AMARELA	X			X				X				X								
ÁPICE VERMELHA			X			X				X				X		X	X	X	X	
SEM GÁS	X	X				X				X				X		X	X	X	X	
COM GÁS					X				X				X							
MEIO SIM																				
INDOL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MOBILIDADE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MEIO SIMMONS																				
AZUL	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
AÇUCARES	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
TER	-	-	-	-	+-	-	+	+	+-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	+	+-	+-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	+-	-	-	-	+	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-
MAT	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	+	+	+-	-	-	+	+-	-	+-	+	-	-	-	+-	-	-	+	+
ARA	-	-	-	-	+-	-	-	-	+-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	+	+	+	+	-	-	+-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
LAC	-	-	-	+	+-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	+-	-	-	-	+-	+-	+	+-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	+-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
OXIDASE	+		-		-		+		-		+		-		+		-		+	
CATALASE	+		-		+		-		+		+		+		+		+		+	
GAM	-		-		+		-		+		-		-		-		+		-	

Legenda: MeioTSI (tríplice sugar and iron); Meio SIM (sulfito, indol e motilidade); Meio SIMMONS (Ágar de citrato de SIMMONS); Trealose (TER), Inositol (INO), Ramnose (RHA), Raffinose (RAF), Mannitol (MAT), Sacarose (SAC), Arabinose (ARA), Maltose (MAL), Lactose (LAC), Dulcitol (DUL), Sorbitol (SOR), Adonitol (ADO).

ANEXO A - Relatório do laboratório ALAC – Amostra BSP 2



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 17934/2013

1 - Cliente

Razão Social: [REDACTED]

Endereço: [REDACTED]

2 - Informações da Amostra

Identificação: Líquido do BSP-2

Responsável pela Coleta: Própria empresa

Data e Hora da Coleta: 20/03/2013 - 09h e 30min

Data e Hora do Recebimento: 21/03/2013 - 09h e 07min

Período de Realização dos Ensaios: 21/03/2013 a 18/04/2013

3 - Descrição dos Ensaios

4 - Resultados

Parâmetro	Unidade	Resultado	Desvio Padrão	Método	Limite de detecção
Cromo Total	m g/L	0,109	0,0854	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,001
Mangânês Total	m g/L	0,451	0,094	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,001
Níquel Total	m g/L	0,090	0,01664	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,002

Legenda:

n.d. - Não Detectado NMP - Número Mais Provável UFC - Unidade Formadora de Colônia UNT - Unidade Nefelométrica de Turbidez
 "<" -- Resultados iniciados com este sinal, configura AUSÊNCIA de crescimento microbiano

5 - Comentários

FEPAM Nº: 00040 / 2012-DL

Amostragens realizadas pelo laboratório Alac seguem a IT014-DA (instrução de trabalho para coleta e amostragem de águas e efluentes).

*Ensaio reconhecido pela Rede Metrológica/RS, conforme NBR ISO/IEC 17025:2005.

Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam exclusivamente à amostra ensaiada. O relatório de ensaio só deverá ser reproduzido na íntegra, não deve ser parcialmente reproduzido sem a prévia autorização do Laboratório Alac.

Garibaldi, 30 de abril de 2013

Código de Assinatura Eletrônica: 48368D1C0920F7043326AE33F170410D

Grasiela Fittarelli
 Engenheira Química
 CRQ - V - 05303203

Vide escopo no site www.alac.com.br

REDE
 METROLÓGICA
RS

LABORATÓRIO RECONHECIDO SEGUNDO
 A NORMA NBR ISO/IEC 17025



Ministério da Agricultura
 Pecuária e Abastecimento

01 de 01

ANEXO B - Relatório do laboratório ALAC – Amostra BSP 3



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 17935/2013

1 - Cliente

Razão Social: [REDACTED]

Endereço: [REDACTED]

2 - Informações da Amostra

Identificação: Líquido do BSP-3

Responsável pela Coleta: Própria empresa

Data e Hora da Coleta: 20/03/2013 - 09h e 30min

Data e Hora do Recebimento: 21/03/2013 - 09h e 07min

Período de Realização dos Ensaios: 21/03/2013 a 18/04/2013

3 - Descrição dos Ensaios

4 - Resultados

Parâmetro	Unidade	Resultado	Desvio Padrão	Método	Limite de detecção
Cromo Total	m g/L	0,130	0,0202	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,001
Manganês Total	m g/L	0,119	0,0411	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,001
Níquel Total	m g/L	0,132	0,0341	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,002

Legenda:

n.d. - Não Detectado NMP - Número Mais Provável UFC - Unidade Formadora de Colônia UNT - Unidade Nefelométrica de Turbidez
"c" - Resultados iniciados com este sinal, configura AUSÊNCIA de crescimento microbiano

5 - Comentários

FEPAM Nº: 00040 / 2012-DL

Amostragens realizadas pelo laboratório Alac seguem a IT014-DA (instrução de trabalho para coleta e amostragem de águas e efluentes).

*Ensaio reconhecido pela Rede Metrológica/RS, conforme NBR ISO/IEC 17025:2005.

Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam exclusivamente à amostra ensaiada. O relatório de ensaio só deverá ser reproduzido na íntegra, não deve ser parcialmente reproduzido sem a prévia autorização do Laboratório Alac.

Garibaldi, 30 de abril de 2013

Código de Assinatura Eletrônica: B8B7AA426648CC02162935EA6B50944C

Grasiela Fittarelli
Engenheira Química
CRQ - V - 05303203

Vide escopo no site www.alac.com.br

REDE
METROLÓGICA
.....RS

LABORATÓRIO RECONHECIDO SEGUNDO
A NORMA NBR ISO/IEC 17025



Ministério da Agricultura
Pecuária e Abastecimento

01 de 01

GARIBALDI: Rua David Sartori, 601-B. Alfândega-Garibaldi-RS-BR-95720-000 - Fone: +55(54)3388.3232-Fax: +55(54)3388.3200-alac@alac.com.br-
www.alac.com.br

ANEXO C - Relatório do laboratório ALAC – Amostra BSP 4



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 17936/2013

1 - Cliente

Razão Social: [REDACTED]

Endereço: [REDACTED]

2 - Informações da Amostra

Identificação: Líquido do BSP-4

Responsável pela Coleta: Própria empresa

Data e Hora da Coleta: 20/03/2013 - 09h e 30min

Data e Hora do Recebimento: 21/03/2013 - 09h e 08min

Período de Realização dos Ensaios: 21/03/2013 a 18/04/2013

3 - Descrição dos Ensaios

4 - Resultados

Parâmetro	Unidade	Resultado	Desvio Padrão	Método	Limite de detecção
Cromo Total	m g/L	0,407	0,0130	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,001
Manganês Total	m g/L	0,179	0,0323	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,001
Níquel Total	m g/L	0,405	0,0075	Standard Methods 22 st - Método 3120 B [PNT003-AB]	0,002

Legenda:

n.d. - Não Detectado NMP - Número Mais Provável UFC - Unidade Formadora de Colônia UNT - Unidade Nefelométrica de Turbidez
 "<" - Resultados iniciados com este sinal, configura AUSÊNCIA de crescimento microbiano

5 - Comentários

FEPAM Nº: 00040 / 2012-DL

Amostragens realizadas pelo laboratório Alac seguem a IT014-DA (instrução de trabalho para coleta e amostragem de águas e efluentes).

*Ensaio reconhecido pela Rede Metrológica/RS, conforme NBR ISO/IEC 17025:2005.

Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam exclusivamente à amostra ensaiada. O relatório de ensaio só deverá ser reproduzido na íntegra, não deve ser parcialmente reproduzido sem a prévia autorização do Laboratório Alac.

Garibaldi, 30 de abril de 2013

Código de Assinatura Eletrônica: CD7AEAD0D269DE7FC2977D2A9A909F7C

Grasiela Fittarelli
 Engenheira Química
 CRQ - V - 05303203

Vide escopo no site www.alac.com.br



01 de 01

GARIBALDI: Rua David Sartori, 601-B. Alfândega-Garibaldi-RS-BR-95720-000 - Fone: +55(54)3388.3232-Fax: +55(54)3388.3200-alac@alac.com.br-
www.alac.com.br