UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Produção e ação de biossurfactante produzido por bactérias
em meios salinos contaminados por hidrocarbonetos
aromáticos

Ellen Cristina Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Produção e ação de biossurfactante produzido por bactérias
em meios salinos contaminados por hidrocarbonetos
aromáticos

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Ellen Cristina Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S729p	<p>Souza, Ellen Cristina</p> <p>Produção e ação de biossurfactante produzido por bactérias em meios salinos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos / Ellen Cristina Souza. -- São Paulo, 2013.</p> <p>166p</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.</p> <p>Orientador: Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza</p> <p>1. Bioreator : Biotecnologia 2. Detergente : Físico-química 3. Micela : Físico-química I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza, orientador.</p> <p>620.8 CDD</p>
-------	--

Ellen Cristina Souza

Produção e ação de biossurfactante produzido por bactérias
em meios salinos contaminados por hidrocarbonetos
aromáticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Aos meus pais, Noemi e Leonardo,
que sempre me apoiaram em tudo o que
fiz e por todo amor e carinho.*

*“Bem aventurado o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento”.*

Provérbios 3:13

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e especialmente a Deus pela ajuda, força e perseverança que Este tem me proporcionado. Por ter sido o meu guia, iluminando minha mente e me dando sabedoria para entender Seu querer em minha vida.

A meus pais pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, pela excelente orientação nesta reta final da minha dissertação. Declaro aqui minha enorme admiração e agradeço pela confiança, apoio e incentivo.

À Prof. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna, pela maravilhosa orientação que me dedicou no início do meu mestrado, e pela amizade e carisma e que com alegria e dedicação, fez aprimorar meus conhecimentos. Obrigada pela grande oportunidade que me abriu, pois fazer a pós-graduação na USP possibilitou a realização de um sonho.

Ao Prof. Dr. Dante Augusto Moraes, por ter sido o primeiro a acreditar em mim e me aberto os caminhos para entrar na USP. Obrigada pelos ensinamentos e por estar sempre disposto a colaborar com o trabalho.

Aos Profs. Drs. Attilio Conventi e José Manuel Domínguez González pela contribuição e auxílio na elaboração dos artigos.

A todos os professores, sem exceção, pelos conhecimentos a mim passados e por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos Gabriel, Fabio, Eduardo, Grazielle e Anderson, pela alegria, ajuda e, sobretudo, pelos diálogos amigáveis. E em especial à Karina, pela ajuda nas análises de cromatografia e pelas boas conversas que tivemos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante meu Mestrado.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

SOUZA, E.C. **Produção e ação de biossurfactante produzido por bactérias em meios salinos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos**. 2013. 166f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2013.

A contaminação da água e do solo por hidrocarbonetos aromáticos tem aumentado ao longo dos anos, devido ao seu uso nos mais diversos segmentos industriais. Hidrocarbonetos, tais como tolueno, são descritos como extremamente poluentes, tóxicos e potencialmente mutagênicos e carcinogênicos para os seres humanos. Os hidrocarbonetos são compostos lipofílicos difíceis de serem eliminados, contudo, estes aromáticos podem ser removidos de ambientes contaminados por meio de biorremediação utilizando bactérias produtoras de surfactante. Biossurfactantes são surfactantes principalmente produzidos por microrganismos, os quais promovem a quebra das moléculas de hidrocarbonetos, através da formação de micelas, aumentando a sua mobilidade, a biodisponibilidade e sua exposição à bactérias favorecendo a biodegradação do hidrocarboneto. A produção deste tensoativo exige meios de fermentação e oxigênio para o metabolismo microbiano. Portanto, aeração e agitação são variáveis operacionais importantes para garantir um coeficiente de transferência de massa de oxigênio eficaz (k_La). Para esta finalidade, o k_La foi determinado experimentalmente em diferentes meios de fermentação, especificamente meio salino básico, meio de baixa salinidade, meio Bushnell-Haas e água do mar, por diversas variáveis operacionais. Ensaios foram realizados em agitador rotativo para selecionar, dentre os diferentes tipos de bactérias, nomeadamente *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus megatherium*, o melhor produtor de biossurfactante na presença de tolueno, nos meios de fermentação descritos acima, formulados com diferentes salinidades. A presença de tolueno inibiu o crescimento de microrganismo deslocando seu metabolismo para a produção de biossurfactante. Assim, *B. subtilis* foi capaz de reduzir a tensão superficial (TS) em $29,49 \pm 0,55$ unidades, produzindo cerca de $3,52 \pm 0,06$ mg/L de biossurfactante. Ao elevar o processo para um fermentador de bancada, a quantidade de tolueno no meio de baixa salinidade foi reduzido drasticamente após 12 horas de crescimento (de 45 ml para 7,43 ml), quando *B. subtilis* foi utilizado, reduzindo o TS em 22,6 unidades (com concentração de biossurfactante de 3,02 mg/L). Os resultados obtidos mostraram que o *B. subtilis* pode ser considerado um microrganismo promissor para ser utilizado na biorremediação de locais contaminados por tolueno.

Palavras-chave: Biossurfactante; Tolueno; tensão superficial; *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

SOUZA, E.C. **Production and action of biosurfactant produced by bacteria in saline media contaminated with aromatic hydrocarbons**. 2013. 166f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2013.

Contamination of water and soil by aromatic hydrocarbons has been increasing along the years, due to its use in various industrial segments. Hydrocarbons, such as toluene, are described as extremely polluting, toxic, potentially carcinogenic and mutagenic to humans. Hydrocarbons are lipophilic compounds difficult to be disposed of; however, the aromatic ones can be removed from contaminated environments via bioremediation using surfactant-producing bacteria. Biosurfactants are surfactants produced mainly by microorganisms, which promote the breaking of hydrocarbons molecules, by means of the formation of micelles, increasing their mobility, bioavailability and exposure to bacteria favoring hydrocarbon biodegradation. This tensoactive production requires oxygen and fermentation media for the microorganism metabolism. Thus, aeration and agitation are important operating variables to ensure an effective oxygen mass transfer coefficient ($k_L a$). To this purpose, such a response was experimentally determined in this study in different fermentation media, specifically basal saline medium, low saline medium, Bushnell-Haas medium and sea water, and correlated with the above operating variables. Rotary shaker essays were performed to select, among different bacteria, namely *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium* and *Bacillus licheniformis*, the best biosurfactant producer in the presence of toluene, in fermentative broths described above, formulated with different salinities. The presence of toluene inhibited the growth of microorganism shifting the metabolism to the production of biosurfactant. Thus, *B. subtilis* was able to reduce the surface tension (ST) in 29.49 ± 0.55 units producing up to 3.52 ± 0.06 mg/L of biosurfactant. Scaling up the process to a bench fermentor, the quantity of toluene in the low salinity medium was reduced drastically after 12 h of growth (from 45 mL to 7.43 mL), when *B. subtilis* was used, reducing the ST in 22.6 units (biosurfactant concentration of 3.02 mg/L). The results obtained showed that *B. subtilis* can be considered a promising microorganism to be used for the bioremediation of sites contaminated by toluene.

Keywords: Biosurfactant; Toluene; surface tension; *Bacillus subtilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Valores de tensão superficial em água destilada (A) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações ($\mu\text{g/L}$): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$)

35

Figura 2.2. Valores de tensão superficial em meio de baixa salinidade (BS, 11 mOsmol/L) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações ($\mu\text{g/L}$): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$)

36

Figura 2.3. Valores de tensão superficial em meio Bushnell-Haas (BH, 110 mOsmol/L) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações ($\mu\text{g/L}$): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$)

37

Figura 2.4. Valores de tensão superficial em água do mar (AM, 1110 mOsmol/L) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações ($\mu\text{g/L}$): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$)

38

Figura 3.1. Valores de Tensão Superficial em meio BS, BH e AM com ou sem tolueno, usando *Bacillus licheniformis* (□), *Bacillus megatherium* (○), *Bacillus subtilis* (◇) e *Pseudomonas putida* (△) como microrganismos produtores de biossurfactante em diferentes tempos de fermentação (48, 72 e 96 h). Valores médios ($n = 3$) $\pm$ desvios padrão com letras diferentes na mesma coluna mostrando que elas diferem significativamente entre os valores do mesmo parâmetro ($P < 0,05$)

53

Figura 3.2. Determinação de tensão superficial (◆); concentração de tolueno (■); concentração celular (▲); concentração de biossurfactante (●) em meio BS usando *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor de biossurfactante durante o processo fermentativo em biorreator

58

Figura 3.3. Determinação de tensão superficial (◆); concentração de tolueno (■); concentração celular (▲); concentração de biossurfactante (●) em meio BH usando *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor de biossurfactante durante o processo de fermentação em biorreator

59

Figura 3.4. Determinação de tensão superficial (◆); concentração de tolueno (■); concentração celular (▲); concentração de biossurfactante (●) em meio AM usando *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor de biossurfactante durante o processo de fermentação em biorreator

60

Figura 3.5 Cultivo demonstrando a produção de biossurfactante em biorreator de bancada utilizando *Bacillus subtilis* em meio BS (A), meio BH (B) e meio AM (C), na presença de tolueno

62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Tecnologias de remediação de solos e águas subterrâneas	12
Tabela 1.2. Biossurfactantes, organismos produtores e suas aplicações.....	21
Tabela 2.1. Constituintes dos meios de cultivo: água do mar (AM), meio salino (MS), meio Bushnell-Haas (BH) e meio de baixa salinidade (BS).....	28
Tabela 2.2. Valores de coeficiente de transferência de massa de oxigênio ($k_L a$), agitação (rpm), aeração (vvm) e osmolaridade (mOsm/L) em água destilada (A), meio salino (MS), meio de baixa salinidade (BS), meio Bushnell-Haas (BH) e água do mar (AM), na ausência ou na presença de 2% de glicose (Gli), 5% de extrato de levedura (EL) e 3% de Tolueno (Tol).....	32
Tabela 2.3. Correlação de coeficientes α e β estimados para água destilada (A), meio salino (MS), meio de baixa salinidade (BS), meio Bushnell-Haas (BH) e água do Mar (AM) na ausência ou na presença de 2% de glicose (Gli), 5% de Extrato de levedura (EL) e 3% de tolueno (Tol) por meio de regressão linear da Eq. (1).....	34
Tabela 3.1. Crescimento microbiano de diferentes cepas em meio de baixa salinidade (BS) na ausência ou na presença de tolueno. Média dos valores ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).	50
Tabela 3.2. Crescimento microbiano de diferentes cepas em meio Bushnell-Haas (BH) na ausência ou na presença de tolueno. Média dos valores ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).	51
Tabela 3.3. Crescimento microbiano de diferentes cepas em água do mar (AM) na ausência ou na presença de tolueno. Média dos valores ($n=3$) $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).	52
Tabela 3.4. Crescimento bacteriano em meios de baixa salinidade (BS), Bushnell-Haas (BH) e água do mar artificial (AM) na ausência de tolueno.....	55
Tabela 3.5. Crescimento bacteriano em meios de baixa salinidade (BS), Bushnell-Haas (BH) e água do mar artificial (AM) na presença de tolueno. Média dos valores ($n=3$) $\pm$ desvio-padrão.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[BSF]	Concentração de biossurfactante (mg/L)
A	Constante
α	Inclinação linear da reta correlacionando $\ln k_L a$ para $\ln N^3 D^2$
AM	Meio de Água do mar artificial
BH	Meio Bushnell-Haas
BS	Meio de baixa salinidade
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
C	Concentração de Oxigênio (g/m^3)
C^*	Concentração de saturação de oxigênio (g/m^3)
CMC	Concentração Micelar Crítica
D	Diâmetro do Impulsor (m)
dC/dt	Taxa de acumulação de O_2 em fase líquida ($\text{g/m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)
$k_L a$	Coefficiente de transferência de massa de Oxigênio (s^{-1})
MS	Meio Salino Básico
N	Velocidade rotacional do impulsor (s^{-1})
RBC	Concentração baseada em risco
β	Inclinação linear da reta correlacionando $\ln k_L a$ para $\ln Vs$
t	Tempo (s)
TS	Tensão Superficial (mN/m)
V_s	Velocidade superficial de borbulhamento de ar ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v

CAPITULO I.....	8
-----------------	---

REVISÃO DE LITERATURA – O PAPEL DOS BIOSSURFACTANTES NA BIORREMEDIAÇÃO.....	8
---	---

1.1. CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS.....	8
1.1.1. Riscos gerados pelos hidrocarbonetos.....	9
1.2. REMEDIAÇÃO DOS COMPOSTOS BTEX.....	12
1.3. BIOSSURFACTANTE.....	16
1.3.1. Mecanismo de ação e eficiência do biossurfactante.....	17
1.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES.....	19

CAPÍTULO II.....	23
------------------	----

EFEITOS DA AERAÇÃO E DA AGITAÇÃO NO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA AR-LÍQUIDO EM MEIOS DE CULTIVO DE DIFERENTES SALINIDADES USADOS EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO.....	23
---	----

2.1 INTRODUÇÃO.....	23
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
2.2.1. Meios de fermentação.....	28
2.2.2. Fermentador.....	28
2.2.3. Osmolaridade.....	29
2.2.4. Determinação de k_La	29
2.2.5. Correlação de k_La com variáveis operacionais.....	30
2.2.6. Efeito da surfactina e do tolueno na tensão superficial.....	30
2.3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
2.3.1 Coeficiente de transferência de massa de oxigênio (k_La).....	31
2.3.2 Correlações adimensionais para previsão de k_La	33
2.3.3 Efeito da surfactina e do tolueno na tensão superficial dos diferentes meios de cultivo.....	34
2.4. CONCLUSÃO.....	39

CAPITULO III.....	Erro! Indicador não definido.
-------------------	-------------------------------

INFLUÊNCIA DO TOLUENO E SALINIDADE SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR DIFERENTES CEPAS DE <i>Bacillus</i> :	
---	--

AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO AGITADOR ROTATIVO PARA BIORREATOR DE BANCADA	40
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.2.1. Meios de Crescimento	46
3.2.2. Microrganismos.....	46
3.2.3. Crescimento bacteriano em agitador rotativo	46
3.2.4. Fermentação para produção de biossurfactante em biorreator.....	47
3.2.5. Determinação celular	47
3.2.6. Determinação de biossurfactante.....	47
3.2.7. Análise de hidrocarboneto por cromatografia gasosa (CG).....	48
3.3. RESULTADO E DISCUSSÃO	49
3.3.1. Crescimento de microrganismos em agitador rotativo e produção de biossurfactante.....	49
3.3.2. Fermentação para produção de biossurfactante em biorreator.....	57
3.4. CONCLUSÃO	64
 CONCLUSÕES	 65
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 66
 ANEXO – Artigos Científicos.....	 75

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA – O PAPEL DOS BIOSSURFACTANTES NA BIORREMEDIAÇÃO

1.1. CONTAMINAÇÃO POR HIDROCARBONETOS

A contaminação de solo e das águas subterrâneas por hidrocarbonetos presentes nos combustíveis tem se tornado foco de grande preocupação, tanto em países industrializados quanto nos países em desenvolvimento, em virtude de sua grande distribuição ambiental, que pode atingir o solo, as águas subterrâneas e o ar (LEBRERO et al., 2012). As origens de contaminação são diversas, tais como acidentes no transporte de combustíveis por navios e caminhões; vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, os quais estão sujeitos a corrosões, como os de postos de combustíveis; extração e operações de processamento de petróleo; e liberação inadequada dos resíduos oleosos, gerados pelas indústrias que utilizam os derivados de petróleo na produção de plástico, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos (EPA - Environmental Protection Agency of United States, 2008; LIN et al., 2010).

Embora as petroquímicas e as refinarias de petróleo apresentem vários benefícios à sociedade, elas produzem grande quantidade de resíduos sólidos oleosos (cerca de 10.000 m³ por dia), classificados como resíduos perigosos, que não podem ser reutilizados nem reciclados, sendo inflamáveis, corrosivos, tóxicos ou patogênicos (GAFAROV et al., 2006).

Nas refinarias, o petróleo é convertido em gasolina automotiva e em óleo diesel. A gasolina é composta por hidrocarbonetos hidrofóbicos relativamente voláteis, como alcanos, cicloalcanos, BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno), fenol e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Muitos destes compostos são descritos como extremamente poluentes, pois são tóxicos e apresentam potencial carcinogênico e mutagênico para seres humanos (JANBANDHU; FULEKAR, 2011). Os hidrocarbonetos BTEX têm se tornado uma grande preocupação na poluição das águas, devido à sua toxicidade e sua facilidade de movimentação no ambiente (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

Segundo o órgão de controle ambiental paulista, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2012), os vazamentos em postos

de combustíveis foram responsáveis por 76% dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo em 2012, que corresponde a 3.510 áreas. Cerca de 90% dos hidrocarbonetos da gasolina derramados no meio ambiente, encontrados em fontes de água potável, é composto por BTEX, suscitando, assim, preocupações de saúde ambiental, por causa de suas propriedades tóxicas, mutagênicas e cancerígenas (JANBANDHU; FULEKAR, 2011).

Quando ocorrem vazamentos dos tanques de combustíveis, os hidrocarbonetos se dispersam, penetrando no solo. Segundo Bachu (2008), a migração destes compostos é regulada pela formação de quatro fases diferentes, denominadas: Fase líquida residual – os resíduos líquidos ficam imóveis, adsorvidos ou retidos nos sólidos do solo; Fase líquida livre – os líquidos migram facilmente pelo solo, podendo atingir a água subterrânea; Fase dissolvida – os hidrocarbonetos formam películas na superfície sólida ou na água do solo e, ao atingirem a água subterrânea, formam a pluma de contaminação; e Fase vapor – quando se juntam ao vapor do solo, podendo condensar-se e adsorver-se na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo.

A alta mobilidade desses hidrocarbonetos entre solo-água está relacionada ao seu baixo coeficiente de partição octanol-água, que garante a absorção lenta pelo solo e permite seu o transporte pela água, migrando rapidamente através do solo e favorecendo a contaminação do lençol freático (FARHADIAN et al., 2008).

1.1.1. Riscos gerados pelos hidrocarbonetos

As preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas pelo petróleo e seus derivados vem aumentando, por serem um dos principais contaminantes do meio ambiente. Os hidrocarbonetos BTEX estão presentes na composição da gasolina e do óleo diesel, sendo os primeiros que atingem o lençol freático, pois são os constituintes que possuem maior solubilidade em água (MARIANO et al., 2007). Por consequência, estes compostos altamente tóxicos (exceto etilbenzeno) são os maiores causadores de morte por toxicidade (JANBANDHU; FULEKAR, 2011).

Fellenberg (1980) já havia descrito que o petróleo e seus derivados, quando em contato com a água, se espalham, formando uma fina película sobre a superfície, que impede a troca de gases entre o ar e a água e a chegada de luz ao fitoplâncton, comprometendo a cadeia alimentar. Confirmando esta teoria, Asimiea e

Sam-Wobo (2011) observaram o impacto de resíduos de hidrocarbonetos sobre comunidades de fitoplâncton, que sofreram mudanças estruturais devido à presença destes compostos.

Um litro de óleo pode esgotar o oxigênio de um milhão de litros de água e formar uma fina camada sobre a superfície de 1.000 m² de solo em poucos dias, bloqueando a passagem de luz e água, que impede a respiração e a fotossíntese das plantas ali presentes (YEUNG et al., 2011). Nas plantas, o óleo as impede de realizar a respiração e a fotossíntese, devido à vedação da entrada dos estômatos. No solo, inibe a absorção de nutrientes pelas raízes das plantas (FELLENBERG, 1980).

O ambiente marinho tem sofrido com constantes derramamentos de óleo, fazendo do petróleo um dos mais abundantes contaminantes orgânicos do mar. A mídia tem denunciado constantemente o vazamento de milhares de toneladas de petróleo (OESP, 2000 a 2013).

Metade da produção mundial de petróleo (em torno de três bilhões de toneladas/ano) é transportada por navios pelos oceanos, aumentando os níveis de contaminação por hidrocarbonetos em vários ecossistemas marinhos, devido aos acidentes. No entanto, a maior fonte de entrada de hidrocarbonetos no ambiente marinho são as operações rotineiras, como lavagens de navios, vazamentos naturais de óleo no fundo dos oceanos e principalmente por acidentes na exploração e no transporte de petróleo (MARQUES JR.; MORAES; MAURAT, 2009).

No Brasil, um dos derramamentos mais impactantes ocorreu em novembro de 2011, quando houve um grande vazamento de petróleo da plataforma Sedco 706, operada pela companhia Chevron na Bacia de Campos (Rio de Janeiro), equivalente a 594,3 mil litros, atingindo cerca de 163 Km² (THOMÉ, 2011).

A ameaça potencial dos hidrocarbonetos à saúde humana está ligada às suas propriedades físico-químicas, que permitem que estes compostos sejam absorvidos pela pele e rapidamente se distribuam por todo o organismo, se ingeridos ou inalados (COSTA et al., 2012).

A exposição aos hidrocarbonetos do grupo BTEX por tempo prolongado em baixas concentrações apresenta uma série de efeitos crônicos. Dentre estes, o benzeno é considerado o mais tóxico e com potencial de causar depressão das células primitivas sanguíneas pluripotentes, estendendo-se por qualquer fase da maturação celular; provocar danos na medula óssea, leucemia e câncer de fígado. O

valor estimado da dosagem mínima letal (LDL) para humanos é de 194 mg/kg (CAZARIN; AUGUSTO; MELO, 2007).

Em 2000, Machado descreveu a embriotoxicidade dos hidrocarbonetos, relatando que mulheres que haviam sido expostas a altos níveis de benzeno em suas profissões apresentaram alterações menstruais, diminuição do tamanho dos ovários e potencial redução da fertilidade.

O tolueno apresenta toxicidade sistêmica moderada para os seres humanos. Se ingerido, o tolueno é absorvido completamente pelo sistema gastrointestinal e rapidamente se distribui pelo corpo, principalmente nos tecidos adiposos, sendo metabolizado e excretado pela urina. Se inalado, este hidrocarboneto compromete o sistema nervoso central e pode causar excitação ou depressão; posteriormente, pode causar também desorientação, tremores, desânimo, alucinações, convulsões e coma. O tolueno pode, ainda, provocar alterações eletrolíticas, arritmias cardíacas e fraqueza muscular, irritação nas mucosas, anomalias transitórias nas atividades enzimáticas no fígado e problemas renais (ASIMIEA; SAM-WOBO, 2011; ZHANG et al., 2013). Além disto, efeitos embriotóxicos e fetotóxicos têm sido observados, embora não haja nenhuma evidência clara de atividade teratogênica ou carcinogênica em animais de laboratório ou humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

O etilbenzeno e o xileno, de toxicidade sistêmica baixa, geralmente são armazenados nos tecidos adiposos, sendo quase completamente metabolizados e excretados na urina. Ambos são depressores do sistema nervoso central, sendo o primeiro um irritante neurossensorial e o segundo um irritante da pele e mucosas. Estudos realizados com os dois hidrocarbonetos demonstram evidências negativas quanto à teratogenicidade, à carcinogenicidade, à metagênese ou à genotoxicidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Segundo a EPA (2012), a concentração química específica para atingir o nível de risco de um contaminante é denominada Concentração Baseada em Risco (RBC). Segundo esta agência, em água subterrânea, a RBC de benzeno é de 2×10^{-4} mg/kg, de tolueno é de $5,9 \times 10^{-1}$ mg/kg, de etilbenzeno corresponde a $1,5 \times 10^{-3}$ mg/kg e de xileno é $1,9 \times 10^{-1}$ mg/kg. Em 2001, a mesma organização determinou que o nível máximo de componentes de BTEX em água potável é de 0,005 mg/L de benzeno, 1,0 mg/L de tolueno, 0,7 mg/L de etilbenzeno e 10 mg/L de xileno.

Em vista dos problemas causados pelos hidrocarbonetos, tanto para o meio ambiente quanto para os seres humanos, a procura por métodos que contribuam na remoção ou na redução destes compostos do meio ambiente tem aumentado.

1.2. REMEDIAÇÃO DOS COMPOSTOS BTEX

Os compostos do grupo BTEX, presente na gasolina e óleo diesel, apresentam maior solubilidade em água que os outros constituintes destes combustíveis, o que explica o fato de que são os contaminantes encontrados em maior quantidade no lençol freático, levados pelas águas subterrâneas, quando ocorrem vazamentos de tanques subterrâneos (MARIANO et al., 2007). Conforme já foi abordado, estes hidrocarbonetos são nocivos à saúde humana, sendo essencial o estudo de métodos que contribuam na sua remoção ou na sua redução do meio ambiente.

Os métodos para remediação dos ambientes contaminados são baseados em meios químicos, físicos ou biológicos. A Tabela 1.1 demonstra as principais técnicas de remediação, assim como os possíveis compostos removidos (COUTINHO; GOMES, 2007).

Tabela 1.1. Tecnologias de remediação de solos e águas subterrâneas

Tecnologia	Descrição	Contaminantes
Bioaeração ou "Bioventing"	Acelera a remoção dos compostos orgânicos voláteis através da aeração da zona vadosa. Estimula a biorremediação <i>in situ</i> .	CHC, BTEX
"Air Sparging" (AIS)	Remove, fisicamente, compostos voláteis e semivoláteis por processos de aeração do solo na zona saturada. Estimula a biorremediação <i>in situ</i> .	CHC, BTEX, PAH, MTBE
"Bio Sparging"	Acelera a biodegradação de compostos orgânicos, por estimular a microflora nativa, através de processos físicos de aeração do solo na zona saturada.	CHC, BTEX, PAH, MTBE
Pump and Treat	Processo físico de extração de águas contaminadas da zona saturada e tratamento <i>ex situ</i> .	CHC, BTEX
Tecnologias Térmicas	Processos térmicos <i>in situ</i> que destroem contaminantes ou possibilitam a aceleração de transferência de fase do contaminante no subsolo.	CHC, BTEX
Biorremediação Acelerada	Altera, artificialmente, as condições bioquímicas naturais do solo ou águas subterrâneas para acelerar a degradação por microrganismos.	CHC, BTEX
Fitorremediação	Plantas apropriadas são utilizadas para promover a extração/biodegradação de compostos orgânicos e metais do solo.	BTEX, CHC, PAH,
Lavagem de Solo/ Reinjeção/ Processos Químicos	A lavagem de solo através de fluido apropriado promove a estripagem e a biodegradação. Compostos químicos (p. ex. surfactantes) podem ser adicionados para acelerar a transferência de fase dos contaminantes.	CHC, BTEX

OBS.: CHC: Compostos de hidrocarbonetos Clorados; PAH: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos; BTEX: Hidrocarbonetos do Petróleo (Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos); MTRE: Multifásica retirada

Atualmente, o método mais empregado é o de bombeamento e tratamento (Pump and Treat), pelo qual o solo e a água contaminados são removidos, por meio de poços de extração, que os bombeiam até a superfície, de modo que possam ser tratados, através de sistemas de filtração e extração de compostos voláteis, em torre de ventilação ou de carvão ativado, para, posteriormente, serem redispostos. Porém, o consumo de energia elétrica e de matérias para o tratamento de água e vapores é elevado, além dos custos envolvidos na operação e na manutenção do sistema de bombeamento e na realização de análises químicas (LOPES et al., 2001).

A remediação por meio químico é realizada pela adição de compostos químicos para deteriorar os contaminantes, isto é, para transformá-los em substâncias menos tóxicas ao meio ambiente. As reações químicas empregadas incluem oxidação, redução, polimerização ou precipitação, sendo a oxidação química a mais usual. Os oxidantes utilizados são: ozônio, peróxidos permanganatos e persulfatos. Apesar de ser um método seguro e de ação rápida, os compostos oxidantes são corrosivos, podem causar explosões, se utilizados em condições inadequadas, e, ao final do processo, podem restar substâncias nocivas à biota local (LOPES et al., 2001).

A remediação química também é aplicada na técnica de lavagem de solo, que utiliza surfactantes que reduzem a tensão interfacial de óleo/água, de forma que o óleo fique em solução, promovendo, assim, a remoção do contaminante. Esta técnica é aplicada *in situ*, mas não muito utilizada, uma vez que este surfactante pode vir a ser mais um contaminante do ambiente (LOPES et al., 2001).

A remoção destes hidrocarbonetos também pode ser realizada por métodos físico-químicos, como é o caso do processo de adsorção. Carvão ativado, utilizado neste processo, permite recuperar o adsorvente e o adsorvido, contudo esta é uma técnica que demanda muitos gastos (DAIFULLAH; GIRGIS, 2003). A montmorilonite (tipo de argila), também tem sido muito utilizada para este fim, pois tem menor custo, não apresenta toxicidade para o meio ambiente e é altamente adsorvente; entretanto, esta argila é de natureza hidrofílica, não sendo eficaz na remoção de poluentes orgânicos não polares, com é o caso dos hidrocarbonetos BTEX (GIL et al., 2011).

Com o avanço das tecnologias sustentáveis, a procura por métodos naturais para a remoção e/ou a degradação de contaminantes de solo e águas tem

aumentado. A remoção destes poluentes pode ser alcançada através do tratamento biológico, que pode proporcionar vantagens em relação aos tratamentos físicos e químicos. Estas vantagens incluem baixo custo de operação, baixo consumo de energia e ausência de produtos residuais (SHIM et al., 2009).

O processo de fitorremediação é realizado com plantas capazes de degradar, extrair, conter ou imobilizar os contaminantes do solo e da água (LOPES et al., 2001). Existem tipos diversos de fitorremediação:

a) Fitoextração e fitovolatilização: processos que utiliza plantas denominadas hiperacumuladoras, que absorvem, retiram e deslocam os contaminantes do solo para suas raízes e porções superiores das plantas.

b) Fitoestabilização: utiliza plantas que imobilizam os contaminantes do solo, por meio da sorção e precipitação na rizosfera.

c) Fitodegradação: promove a degradação de contaminantes orgânicos, através do estímulo da atividade microbiana da rizosfera.

d) Rizofiltração: processo no qual ocorre sorção ou precipitação de contaminantes que estão em solução ao redor das raízes, devido a processos bióticos ou abióticos.

Além da fitorremediação, existe outro processo baseado na utilização de organismos vivos para a remediação de locais contaminados por hidrocarbonetos, denominado biorremediação. Esta técnica consiste na decomposição biológica de hidrocarbonetos por microrganismos que utilizam estes poluentes como fonte de carbono para obtenção de energia, biodegradando-os em dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (BANAT et al., 2010).

Quanto maior for a população de microrganismos degradadores, mais rápido e mais eficiente será o processo de biorremediação. Sendo assim, esta técnica pode ser realizada através da bioestimulação, que compreende a estimulação do crescimento dos microrganismos presentes no local contaminado. Este processo pode ser realizado pela introdução de oxigênio, nutrientes, receptores de elétrons específicos para a degradação do contaminante e de substâncias para correção do pH. Pode também ser feita por bioaugmentação, quando microrganismos indígenas (alóctones) são adicionados no ambiente contaminado, para acelerar e completar a degradação do poluente (LOPES et al., 2001).

A baixa solubilidade e a hidrofobicidade elevada dos hidrocarbonetos os tornam altamente indisponíveis aos microrganismos. Para que estes possam degradar os hidrocarbonetos e utilizá-los como fonte de carbono, os microrganismos produzem o chamado biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997).

Os biossurfactantes são surfactantes sintetizados como produtos metabólicos de diferentes microrganismos, principalmente aeróbicos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, utilizando vários substratos, como carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras, resíduos industriais e agrícolas ou uma mistura destes (PIRÔLLO et al., 2008).

Uma propriedade de grande importância para aplicações industriais e biotecnológicas é a estabilidade da maioria dos biossurfactantes frente a diferentes condições, resistindo às altas temperaturas de autoclavagem (121°C por 20 min) e também às baixas temperaturas (-18°C por 6 meses) e aos diferentes níveis de pH (5-11) encontrados no meio ambiente (MUTHUSAMY et al., 2008).

As principais classes de biossurfactantes conhecidas até o momento, segundo Pirôllo (2006), são glicolipídeos (raminolipídeos, soforolipídeos, trealopídeos), lipopeptídeos e lipoproteínas (peptídeo, viscosina, surfactina, subtilisina, gramicidina, polimixina), ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos e surfactantes poliméricos (emulsan, biodispersan, liposan, carboidrato-lipídeo-proteína, manana-lipídeo-proteína) e surfactantes particulados.

Biossurfactantes apresentam várias vantagens em comparação com os surfactantes sintéticos, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodigestibilidade (que permite sua aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos), possibilidade de serem produzidos a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais, utilizados na biorremediação de locais impactados por óleo, na biodegradação e na detoxicação de efluentes industriais, além de sua eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (PIRÔLLO, 2006).

1.3. BIOSSURFACTANTE

Com o avanço das tecnologias sustentáveis, a procura por compostos naturais biodegradáveis, para a remediação de locais contaminados por hidrocarbonetos, tem aumentado. Estas buscas têm levado à descoberta de que muitos surfactantes podem ter origem natural, fazendo parte de várias estruturas celulares e membranas biológicas. Grande parte destes tensoativos é sintetizada por organismos vivos, como saponinas, produzidas por plantas; glicolipídeos, por microrganismos; e sais biliares, originados de animais. Estes compostos, com propriedades surfactantes e produzidos por microrganismos, são denominados biossurfactantes (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

Biossurfactantes apresentam inúmeras vantagens em relação aos surfactantes de origem química, principalmente em relação à biodegradabilidade, à compatibilidade com o meio ambiente, à baixa toxicidade e à alta seletividade, além de sua atividade, mesmo sob extremas condições de temperatura, pH e salinidade (BANAT et al. 2010). Estes compostos são agentes tensoativos e possuem moléculas anfipáticas (Figura 1.1), com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que atuam entre fluidos de diferentes polaridades (óleo/água e água/óleo), permitindo o acesso aos substratos hidrofóbicos, causando mudanças, como a redução da tensão superficial, e aumentando a área de contato dos compostos insolúveis (como hidrocarbonetos), sua mobilidade, sua biodisponibilidade e, posteriormente, sua biodegradação (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

Os biossurfactantes possuem grupos lipofílicos de proteínas e/ou peptídios com partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos, além de grupos hidrofílicos caracterizados por ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos. São geralmente produzidos na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano, quando há alta densidade celular (SUWANSUKHO et al., 2008).

A biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo pelos biossurfactantes ocorre por meio de dois mecanismos. O primeiro inclui o aumento da disponibilidade biológica do substrato hidrofóbico para microrganismos, com consequente redução da tensão superficial do meio em torno da bactéria e a redução da tensão interfacial entre a parede da célula bacteriana e as moléculas do hidrocarboneto. O outro mecanismo envolve a interação do biossurfactante com a superfície da célula, promovendo modificações na membrana, facilitando a

aderência do hidrocarboneto (aumento de hidrofobicidade) e reduzindo o índice de lipopolissacarídeos da parede celular sem danificar a membrana (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

Assim, os biossurfactantes bloqueiam a formação de pontes de hidrogênio e permitem interações hidrofóbicas-hidrofílicas, que causam o remanejamento molecular e reduzem a tensão superficial do líquido, aumentando sua área superficial e promovendo a biodisponibilidade e a consequente biodegradabilidade (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

Por conseguinte, a produção de biossurfactante é avaliada indiretamente, por meio de tensão superficial, que está relacionada com as forças de atração e repulsão entre as moléculas de um fluido. Para manter as moléculas coesas na superfície líquida, estas exercem uma forte força de atração intermolecular sobre as moléculas mais próximas da superfície, denominada tensão superficial. Assim, os líquidos tendem a diminuir sua área de superfície, formando gotas esféricas que apresentam menor razão superfície/volume. Fisicamente falando, a tensão superficial seria a energia necessária para dilatar a superfície de um líquido. Quanto maior a coesão entre as moléculas do líquido, maior será o trabalho necessário para aumentar a distância entre elas, isto é, quanto maior a força de atração entre as moléculas, maior será a tensão superficial (PIRÔLLO et al., 2008).

1.3.1. Mecanismo de ação e eficiência do biossurfactante

Quando os biossurfactantes são liberados, seus monômeros se organizam de forma esférica (micelas), reduzindo a tensão superficial entre a água e o óleo e contribuindo na formação de micelas, aumentando a exposição do hidrocarboneto às bactérias e ao oxigênio e favorecendo a biodegradação do hidrocarboneto (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2010).

As modificações na membrana, causadas pelo biossurfactante, como a mudança da composição de proteínas ou o aumento da hidrofobicidade da parede celular, pela redução de lipopolissacarídeos, promovem maior acessibilidade aos hidrocarbonetos pelos microrganismos. Isto ocorre devido à dispersão do hidrocarboneto, através de seu encapsulamento em micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012).

A representação da formação de micelas segue o esquema de Stigter, no qual os monômeros de surfactante se organizam em forma esférica com a parte

hidrofóbica, constituindo o núcleo e a porção hidrofílica na parte externa e fazendo interface com a água. Em uma micela, na extremidade hidrofílica do biossurfactante, forma-se uma dupla camada elétrica compacta que circunda a superfície externa da esfera micelar, denominada Camada de Stern (TONDO et al., 2010).

A eficiência do biossurfactante é determinada através da concentração micelar crítica (CMC), ponto no qual começam a se formar as micelas (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2010). Estes agregados são produzidos como resultado de numerosas interações químicas fracas, como van der Waals e pontes de hidrogênio (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012).

O mecanismo de mobilização das moléculas, que provoca a redução da tensão superficial entre ar/água, ocorre em concentrações de biossurfactante abaixo da CMC. O processo de solubilização se inicia em concentrações acima da CMC, devido à formação de micelas que aumentam a solubilidade do óleo (URUM; PEKDEMIR, 2004). O processo de emulsificação começa quando há o acúmulo de biossurfactante, criando uma solução contendo minúsculas gotículas de óleo suspenso no meio aquoso. O alto peso molecular dos biossurfactantes os torna eficientes agentes emulsificantes, sendo também utilizados como aditivos para estimular a biorremediação e a remoção de hidrocarbonetos do meio ambiente (FRANZETTI et al., 2010).

Um biossurfactante eficiente possui baixa CMC; em outras palavras, menor quantidade de surfactante é necessária para diminuir a tensão superficial, demonstrando maior efetividade e eficiência que os surfactantes químicos (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012; DESAI; BANAT, 1997). A surfactina é um dos biossurfactantes mais eficientes que se tem conhecimento, reduzindo a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m, que é próximo do valor mínimo detectável (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

A formação e o acúmulo de biossurfactante estão relacionados a uma série de parâmetros que, segundo Mukherjee, Das e Sen (2006), precisa ser mais bem estudada e compreendida, para que haja maior rendimento da produção destes compostos com menores custos. O futuro promissor dos biossurfactantes depende do uso de matérias-primas de baixo custo e da otimização das condições de cultivo para maior obtenção do produto.

1.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Estudos sobre a utilização de hidrocarbonetos por microrganismo começaram a surgir por volta de 1906, realizados por Sohnger e Kaserer. Após alguns anos, Sohnger, em 1913, demonstrou que alguns microrganismos, principalmente dos gêneros *Mycobacterium* e *Pseudomonas*, eram capazes de oxidar gasolina, querosene, parafina e óleo de parafina a CO₂, água e traços de ácidos orgânicos (ZOBELL, 1946).

A partir de então, vários estudos foram sendo realizados, à procura de espécies capazes de degradar compostos aromáticos. Em 1928, microrganismos dos gêneros *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Bacterium*, *Bacillus* e *Spirillum*, capazes de degradar naftaleno, tolueno, cresol e fenol, foram isolados por Gray e Thornton.

Em 40 anos, mais de 100 espécies de 30 gêneros microbianos distribuídos na natureza foram descritos por sua capacidade de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia (ZOBELL, 1946).

A partir da década de 1990, muitos gêneros de microrganismos foram identificados como degradadores de hidrocarbonetos: *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.* *Xanthomonas maltophilia*, entre outros (MARIANO et al., 2007).

Segundo Weltler-Tonini, Rezende e Grativol et al. (2010), os principais gêneros de bactérias capazes de degradar derivados do petróleo são: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyce* e *Vibrio*.

Além das bactérias, actinomicetos e fungos também são produtores de biossurfactantes. Contudo, quando ocorre a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos por fungos, formam-se trans-dióis, que são potentes carcinogênicos, enquanto que a biodegradação por bactérias origina cis-dióis, que não são ativos biologicamente e não resultam na produção de potenciais carcinógenos (ATLAS, 1995).

A partir de então, foram encontrados nove grupos de bactérias em amostras de óleo proveniente de reservatórios de petróleo, como, por exemplo: *Acinetobacter*,

Arcobacter, *Bacillus*, *Halanaerobium*, *Leuconostoc*, *Marinobacter*, *Streptomyces*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* (SETTE et al., 2007).

Especificamente, em 1908, foi revelada a habilidade dos microrganismos em degradar os hidrocarbonetos derivados do petróleo do grupo BTEX, quando a bactéria *Bacillus hexabovorum*, isolada por Stormer, demonstrou ser capaz de crescer aerobicamente em meio contendo tolueno e xileno (ZOBELL, 1946). Em 1928, Gray e Thornton encontraram, dentre 245 espécies de bactérias isoladas de solos não contaminados, 146 que possuíam capacidade de degradar hidrocarbonetos BTEX.

Os biossurfactantes são metabólitos com atividade superficial, produzidos por microrganismos em soluções aquosas contendo compostos hidrofóbicos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). Estes tensoativos compreendem diferentes estruturas e composições químicas, que variam dependendo do microrganismo que o produz, dos nutrientes do meio de cultura e das condições de cultivo (Tabela 1.2). Consistem principalmente de ácidos graxos, glicolipídeos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Tabela 1.2. Biossurfactantes, organismos produtores e suas aplicações.

Microrganismo	Tipo de biossurfactante	Aplicações
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9	Glicolípídeo e ter-haloselípídeo	Operações de limpeza de derramamento de petróleo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S2	Raminolípídeo	Biorremediação de locais contaminados por petróleo
<i>Pseudozyma siamesis</i> CBS9960	Mannosylerythritol Lipídeo	Promissor biossurfactante de levedura
<i>Pseudozyma graminicola</i> CBS 10092	Mannosylerythritol Lipídeo	Detergentes de lavagem
<i>Pseudomonas libanensis</i> M9-3	Lipopeptídeo	Aplicações ambientais e biomédicas
<i>Bacillus subtilis</i> ZW-3	Lipopeptídeo	Uso farmacêutico, proteção ambiental, cosméticos e recuperação de petróleo
<i>Rhodococcus</i> sp. TW53	Lipopeptídeo	Biorremediação em ambiente marinho
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	Glicolípídeo	Biorremediação em ambiente marinho
<i>R. wratislaviensis</i> BN 38	Glicolípídeo	Aplicações em biorremediação
<i>Bacillus subtilis</i> BSS	Lipopeptídeo	Biorremediação de locais contaminados por hidrocarbonetos
<i>Azobacter chroococcum</i>	Lipopeptídeo	Aplicações ambientais
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS20	Raminolípídeo	Biorremediação de locais contaminados por hidrocarbonetos
<i>Micrococcus luteus</i> BN56	ter-halose tetraester	Biorremediação de locais contaminados por petróleo
<i>Bacillus subtilis</i> HOB2	Lipopeptídeo	Recuperação de petróleo, biorremediação de solo e ambientes marinhos, e em indústrias de alimentos
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	Raminolípídeo	Biorremediação
<i>Nocardiopsis alba</i> MSA10	Lipopeptídeo	Biorremediação
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Raminolípídeo	Aplicações ambientais
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	Mannosylmannitol Lipídeo	Detergentes ou emulsificantes de lavagem

As *Pseudomonas* são conhecidas por sua capacidade em produzir grandes quantidades de glicolípídeos. Estes biossurfactantes produzidos são classificados como raminolípídeos, capazes de reduzir a tensão superficial da água a valores entre 25 e 30 mN/m, com CMC entre 10 e 230 mg/L, dependendo das diferentes fontes microbianas, condições de pH e de salinidade do meio (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011).

Outro microrganismo amplamente estudado quanto à produção de biossurfactantes é o *Bacillus subtilis*, conhecido por sua eficiência comprovada na produção de um lipopeptídeo com atividade superficial, denominado surfactina ou

subtilisina, um dos biossurfactantes mais potentes que se tem conhecimento, reduzindo a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com CMC em água de 24 mM (AL-BAHRY et al., 2012; DESAI; BANAT, 1997).

Devido aos ótimos resultados obtidos com surfactina, tem-se estudado a produção de biossurfactantes por outras espécies de *Bacillus*. Yakimov et al. (1995) publicaram um trabalho sobre a produção de um novo biossurfactante por *Bacillus licheniformis*, denominado lichenisina, que demonstrou ótima estabilidade a diferentes temperaturas, pH e concentrações salinas. Além disto, a lichenisina apresentou capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 28 mM, com CMC menor ou igual a 12mM. Estudos recentes revelam que algumas cepas de *Bacillus megatherium* também produzem biossurfactantes, classificados como glicolípidos (THAVASI; JAYALAKSHMI; BANAT, 2010) ou lipopeptídeos, com capacidade de reduzir a tensão superficial da água para 28-30 mN/m, com CMC de aproximadamente 100 mg/L (PUEYO et al., 2009).

A diversidade de microrganismos capazes de biodegradar poluentes, como o óleo, e produzir biossurfactantes é grande e pouco conhecida. Dependendo do habitat estudado, estima-se que apenas menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas existentes foram descobertas e nomeadas. No entanto, o número de espécies identificadas, com os avanços nas pesquisas, cresce a cada ano (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

CAPÍTULO II

EFEITOS DA AERAÇÃO E DA AGITAÇÃO NO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA AR-LÍQUIDO EM MEIOS DE CULTIVO DE DIFERENTES SALINIDADES USADOS EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

A contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo tem se tornado foco de grande preocupação, tanto em países industrializados quanto nos países em desenvolvimento, em virtude de seu amplo uso na produção de substâncias químicas nos mais variados processos industriais, aumentando sua distribuição ambiental e a contaminação de solo, águas subterrâneas e ar atmosférico (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

As origens de contaminação são diversas: acidentes no transporte de combustíveis por navios, caminhões; vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, como de postos de combustíveis, os quais estão sujeitos a corrosões; extração e operações de processamento de petróleo; e liberação inadequada dos resíduos oleosos, gerados pelas indústrias que utilizam os derivados de petróleo na produção de plástico, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos (EPA, 2008; LIN et al., 2012).

O crescimento acelerado das indústrias e a falta de locais adequados, para a eliminação dos seus resíduos químicos, têm contribuído para a contaminação de solos e águas. Em particular, os hidrocarbonetos aromáticos, tais como tolueno, são gerados em grande quantidade pela indústria do petróleo sendo, muitas vezes, utilizados de forma incorreta e despejados ilegalmente, contaminando o solo, as águas subterrâneas, as águas superficiais, a biota e até mesmo o ar (FARHADIAN et al., 2010; LEBRERO et al., 2012). De acordo com Yeung et al. (2011), um litro de óleo pode esgotar o oxigênio de um milhão de litros de água e, em poucos dias, formar uma fina camada sobre a superfície de 1.000 m² de solo, bloqueando a passagem de luz, que inibe o crescimento de microrganismos e de plantas.

O efeito potencialmente nocivo dos hidrocarbonetos para a saúde humana está ligado às suas propriedades físico-químicas, como a lipofilicidade, que permite que sejam absorvidos pela pele e distribuídos por todo o corpo quando ingeridos ou

inalados (COSTA et al., 2012). De acordo com outros estudos, o tolueno afeta primeiramente o sistema nervoso central, causando excitação ou depressão, com euforia na fase de indução e seguido de desorientação, tremores, alucinações, convulsões e coma. Atividade enzimática anormal, no fígado e no rim, também foi observada (ASIMIEA; SAM-WOBO, 2011; ZHANG et al., 2013).

Em vista dos problemas causados pelos hidrocarbonetos, tanto para o meio ambiente quanto para os seres humanos, tem aumentado a procura por métodos que contribuam na remoção ou na redução destes compostos do meio ambiente (CERQUEIRA et al., 2011).

Um dos processos, baseados na utilização de organismos vivos, para a remediação de locais contaminados por hidrocarbonetos é denominado biorremediação. Esta técnica consiste na decomposição biológica de hidrocarbonetos por microrganismos que utilizam estes poluentes como fonte de carbono para obtenção de energia, biodegradando-os em dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (BANAT et al., 2010).

Com o avanço das tecnologias sustentáveis, tem aumentado a procura por compostos naturais biodegradáveis. A baixa solubilidade e a hidrofobicidade elevada de muitos hidrocarbonetos os tornam altamente indisponíveis aos microrganismos, que, para poder utilizá-los como fonte de carbono, produzem o chamado biossurfactante durante processo de fermentação (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011; DESAI; BANAT, 1997).

O coeficiente de transferência de massa ($k_L a$) é um parâmetro de grande importância implícito durante o bioprocessamento aeróbico (GALACTION et al., 2004); seus valores são influenciados por uma série de fatores, entre os quais o nível de agitação, as características do biorreator, a composição do meio, a concentração e o tipo de microrganismos (JAMNONGWONG et al., 2010); mas, acima de tudo, a transferência de massa de oxigênio desempenha papel-chave nos biorreatores, pois controla o oxigênio disponível para o metabolismo microbiano e, portanto, o $k_L a$ pode ser utilizado como um indicador de tratamento de águas residuais, bem como em vários processos de fermentação e de biorremediação (MINETA et al., 2011).

Em geral, processos biológicos envolvem meios de cultura contendo nutrientes, sais orgânicos, tais como açúcares, hidrocarbonetos ou álcoois, e, por vezes, agentes tensoativos, que são muito mais complexos do que a água limpa (KACZOREK; URBANOWICZ; OLSZANOWSKI, 2010). Portanto, os estudos sobre a

transferência de massa gás-líquido em bioprocessos tornaram-se cada vez mais necessários (KASHID; RENKEN; KIWI-MINSKER, 2011). Vários autores têm relatado recentemente que o avanço de projetos em biorreator continua a ser de alta prioridade para resolver os problemas ambientais e aumentar a transferência de oxigênio da fase gasosa para microrganismos (KASHID; RENKEN; KIWI-MINSKER, 2011; SABRINA et al., 2012).

O tolueno é um hidrocarboneto monoaromático ideal para pesquisas sobre biodegradação. Este composto aromático é produzido em grandes quantidades e é utilizado como combustível ou solvente e como material de partida para a produção de plásticos, fibras sintéticas e pesticidas (FARHADIAN et al., 2010). Através de derramamentos e vazamentos de tanques e de outros lançamentos, os compostos monoaromáticos tornaram-se predominantes contaminantes ambientais, geralmente em misturas.

Os biossurfactantes, produzidos pelos microrganismos para remoção dos contaminantes do ambiente, são polímeros, total ou parcialmente extracelulares, que se acumulam em interfaces com diferentes polaridades. Esta característica permite o bloqueio da formação de pontes de hidrogênio e de certas interações hidrofóbicas-hidrofílicas, que causam o remanejamento molecular e reduzem a tensão superficial do líquido (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

Por conseguinte, a produção de biossurfactante é avaliada, indiretamente, por meio da tensão superficial que, segundo Pirôllo et al. (2008), está relacionada com as forças de atração e repulsão entre as moléculas de um fluido.

Quando os biossurfactantes são liberados, seus monômeros se organizam de forma esférica, de maneira que a porção hidrofóbica fique voltada para o centro, constituindo o núcleo e a parte hidrofílica para a superfície da esfera, fazendo interface com a água (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2010) e gerando modificações na membrana, como o aumento da hidrofobicidade da parede celular pela redução de lipopolissacarídeos, que permite a dispersão do hidrocarboneto através de seu encapsulamento em micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

A eficiência do biossurfactante é determinada através da concentração micelar crítica (CMC), ponto nos quais começam a se formar as micelas (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2010). Um biossurfactante eficiente possui baixa CMC, ou seja, menor quantidade de surfactante é necessária para diminuir a tensão

superficial, demonstrando maior efetividade e eficiência do que os surfactantes químicos (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012).

Um microrganismo amplamente estudado quanto à produção de biossurfactantes é o *Bacillus subtilis*, uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos, anaeróbia facultativa e com eficiência comprovada na produção de biossurfactante tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, contribuindo na remoção de petróleo (AL-BAHRY et al., 2012). As cepas de *Bacillus subtilis* são conhecidas por sua habilidade em produzir um lipopeptídeo com atividade superficial, denominado surfactina ou subtilisina, um dos biossurfactante mais potentes que se tem conhecimento, reduzindo a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com CMC em água de 24 mM (AL-BAHRY et al., 2012; DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Quando os monômeros de biossurfactante se agregam em uma micela, forma-se, na parte hidrofílica que faz interface com a água, uma dupla camada elétrica que a circunda (camada de Stern).

A presença de sal na solução provoca a diminuição das forças de repulsão eletrostáticas presentes nesta camada, permitindo a aproximação da parte polar que favorece a micelização do biossurfactante no sentido vertical, como uma haste, altamente flexível e sem-fim, como agregados de micelas (HANNA et al., 2005). Zhai et al. (2006) confirmaram que o aumento da salinidade promoveu maior agregação dos monômeros de surfactante. Segundo estes autores, em meios sem a presença de sal, formam-se apenas micelas esféricas, mas na presença de sal ocorre a formação de vesículas, necessitando de menor concentração de biossurfactante para tanto.

A formação e o acúmulo de biossurfactante estão relacionados a uma série de parâmetros que, segundo Mukherjee, Das e Sen (2006), precisam ser mais bem estudados e compreendidos, para que haja maior rendimento da produção destes compostos com menores custos. O futuro promissor dos biossurfactantes depende do uso de matérias-primas de baixo custo e da otimização das condições de cultivo para maior obtenção do produto.

Para que a biorremediação seja bem sucedida, o conhecimento do k_La é necessário. Neste trabalho, foram investigados os efeitos da aeração e da agitação sobre o k_La em meios com diferentes composições salinas, para sua possível utilização em processos de biorremediação aeróbicas, quer na presença de tolueno

como fonte de carbono ou não. Também foi analisada, em seguida, a influência da salinidade frente a diferentes concentrações de surfactina padrão (Sigma), a fim de verificar uma correlação entre estas condições na remoção de tolueno dos meios salinos estudados. Compreender estes efeitos é necessário para executar trabalhos futuros dedicados à seleção das condições ideais para a atividade eficaz dos microrganismos que degradam o hidrocarboneto.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Meios de fermentação

Foram utilizados 4 diferentes meios de cultivo com salinidades diferentes, denominados meio salino (MS), meio de baixa salinidade (BS), meio Bushnell-Haas (BH) e meio simulando a água do mar (AM), cujas composições são detalhadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Constituintes dos meios de cultivo: água do mar (AM), meio salino (MS), meio Bushnell-Haas (BH) e meio de baixa salinidade (BS).

Composição dos meios de cultivo (mg/L)							
AM		MS		BH		BS	
NaCl	27,6	MgSO ₄ ·7H ₂ O	50,0	CaCl ₂ ·2H ₂ O	23,0	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6,9	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,0	MgSO ₄	20,0	MgSO ₄	2,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5,4	KCl	10,0	KH ₂ PO ₄	61,0	KH ₂ PO ₄	6,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,4	NaNO ₃	40,0	K ₂ HPO ₄	55,0	K ₂ HPO ₄	5,5
KCl	0,6	KH ₂ PO ₄	50,0	NH ₄ NO ₃	50,0	NH ₄ NO ₃	5,0
NaHCO ₃	0,2	K ₂ HPO ₄	65,0	FeCl ₃	69,0	FeCl ₃	6,9
KBr	0,03	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10,2	-	-	-	-
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,02	-	-	-	-	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01	-	-	-	-	-	-
NaHPO ₄	0,01	-	-	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,001	-	-	-	-	-	-

2.2.2. Fermentador

Todos os experimentos foram conduzidos a 30 ± 1 °C em biorreator de bancada de 2 L, modelo BioFlo[®]/Celligen[®] 115 (New Brunswick – Enfield, CT, USA), equipado com sistema eletrônico de controle de temperatura, medidor de oxigênio dissolvido, velocidade de agitação e aeração controlada. Os principais detalhes de operação do biorreator de bancada foram: volume utilizado, 1,0 L; diâmetro interno, 12 cm; altura, 18,5 cm; número de chicanas, 3; altura das chicanas, 14 cm; largura da chicana, 2,3 cm; número de impulsores, 2; distância do impulsor da placa superior, 5 cm; tipo de impulsor, disco de turbina Rushton; diâmetro do disco do rotor, 5,0 cm; largura da lâmina do impulsor, 1,5 cm; comprimento da lâmina do impulsor, 1,5 cm; número de lâminas do impulsor, 6.

2.2.3. Osmolaridade

A osmolaridade dos meios, expressa em mOsmol/L, foi medida utilizando micro-osmômetro crioscópico Ganotec (Osmomat 030), determinada através do ponto de congelamento de 50 µL de cada amostra. O equipamento foi calibrado com solução padrão do equipamento (300 Osm/kg de NaCl), utilizando água destilada como controle.

2.2.4. Determinação de k_La

O valor de k_La foi determinado em todos os meios de cultivo estudados, sendo estes suplementados ou não com 2% de glicose, 5% de extrato de levedura ou 3% de tolueno; sem a presença de microrganismos, sob três condições diferentes de aeração (0,5; 1,0 e 1,5 vvm) e quatro diferentes condições de agitação (50, 100, 200 e 300 rpm), expresso em s^{-1} .

Para esta finalidade, o oxigênio dissolvido no líquido foi removido, injetando-se nitrogênio (N_2) e verificando-se a redução da concentração de oxigênio por meio de um sensor. Depois da concentração de oxigênio ter atingido o valor aproximado de 0% de saturação a 30 °C, a injeção de N_2 foi interrompida e iniciou-se o borbulhamento de ar. A concentração de oxigênio foi monitorada a cada 30s, até atingir o valor próximo a 100% de saturação (ponto de saturação).

De acordo com a literatura (OZBEK; GAYIK, 2011), o balanço de massa de oxigênio dissolvido em uma mistura em fase líquida pode ser descrito por:

$$\frac{dC}{dt} = k_La (C^* - C) \quad (1)$$

onde dC/dt é a taxa de acumulação de O_2 em fase líquida ($g/m^3.s^{-1}$), C^* a concentração de saturação de oxigênio (g/m^3) e C a concentração de oxigênio (g/m^3) em todos os meios de cultivo.

A integração desta equação fornece:

$$\ln \left(1 - \frac{C}{C^*} \right) = K_La \cdot t \quad (2)$$

O valor de k_La foi então estimado como o declive da reta obtida plotando-se os valores experimentais de $\ln (1 - C / C^*)$ em função do tempo, após eliminação de pontos aleatórios.

2.2.5. Correlação de k_La com variáveis operacionais

Como sugerido por Yoshida et al. (1960) e Richards (1961), o k_La pode ser relacionado com o número de potência (N^3D^2) e a taxa de borbulhamento de ar, expresso como velocidade superficial (V_s) ($m \cdot s^{-1}$), através da seguinte equação:

$$k_La = A(N^3D^2)^\alpha [V_s]^\beta \quad (3)$$

onde N (s^{-1}) é a velocidade rotacional do impulsor; D representa o diâmetro do impulsor (m); A uma constante; e α e β são expoentes empíricos a serem determinados experimentalmente para cada condição.

2.2.6. Efeito da surfactina e do tolueno na tensão superficial

Primeiramente, surfactina a partir de *Bacillus subtilis* (número de catálogo S3523, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) foi diluída em água destilada até a concentração de 1 mg/mL. Em seguida, 2 mL de cada um dos meios de cultivo estudados foram transferidos para 12 tubos de ensaio de 5 mL, sendo que em 6 dos tubos foram adicionados 3% de tolueno. Adicionou-se, então, surfactina em diferentes concentrações (5, 10, 50, 100, 200, e 500 $\mu g/L$), nos meios de cultivo isentos de tolueno ou contendo tolueno. As amostras foram colocadas em shaker, modelo G-25KC (New Brunswick), a 30 °C e 200 rpm, e a tensão superficial de cada meio de cultivo foi medida, no tempo inicial (0 hora) e no tempo final (48 h) de cultivo.

2.3. RESULTADO E DISCUSSÃO

2.3.1 Coeficiente de transferência de massa de oxigênio (k_La)

O coeficiente de transferência de massa de oxigênio representa o parâmetro mais importante implícito durante o bioprocesso aeróbico. Portanto, o conhecimento do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La) é extremamente importante para se obter sucesso durante um processo fermentativo. Particularmente, os valores de k_La são afetados pelas diferentes características de biorreatores, pela composição dos meios de cultivo, pelo tipo e pela concentração de microrganismos, etc. Além disso, a transferência de massa de oxigênio exerce papel fundamental no controle de oxigênio disponível para o metabolismo dos microrganismos nos biorreatores.

Nesta parte do estudo, os efeitos da composição dos diferentes meios de cultivo, da salinidade e da concentração de surfactante sobre o coeficiente de transferência de massa de oxigênio (k_La , s^{-1}) e da osmolaridade (mOsmol/L), foram avaliados em todos os meios de cultivo estudados, sob diferentes condições de aeração e agitação (Tabela 2.2). Como esperado, a partir do conhecimento geral sobre a distribuição de oxigênio em líquidos, em todos os meios, as melhores condições de operação, isto é, aquelas que garantiram valores mais elevados de k_La , foram obtidas com 300 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração. Ao comparar os valores de k_La com a osmolaridade, em geral, estes parecem estar inversamente relacionados; entretanto uma estreita correlação entre estes dois parâmetros não pode ser estabelecida.

Tabela 2.2. Valores de coeficiente de transferência de massa de oxigênio (k_La , s^{-1}), agitação (rpm), aeração (vvm) e osmolaridade (mOsm/L) em água destilada (A), meio salino (MS), meio de baixa salinidade (BS), meio Bushnell-Haas (BH) e água do mar (AM), na ausência ou na presença de 2% de glicose (Gli), 5% de extrato de levedura (EL) e 3% de Tolueno (Tol).

Amostra	k_La (s^{-1})					Osmolaridade (mOsm/L)
	rpm vvm	50	100	200	300	
A	0,5	0,004	0,004	0,008	0,019	0,0
	1,0	0,005	0,006	0,010	0,015	
	1,5	0,007	0,010	0,012	0,019	
MS	0,5	0,003	0,004	0,005	0,007	104,0
	1,0	0,006	0,005	0,008	0,013	
	1,5	0,008	0,008	0,010	0,017	
MS + Gli	0,5	0,004	0,004	0,006	0,010	229,0
	1,0	0,006	0,006	0,009	0,015	
	1,5	0,008	0,008	0,011	0,018	
MS + EL	0,5	0,003	0,003	0,004	0,007	452,0
	1,0	0,003	0,004	0,006	0,013	
	1,5	0,005	0,008	0,009	0,011	
BS	0,5	0,004	0,003	0,003	0,009	11,0
	1,0	0,006	0,008	0,011	0,018	
	1,5	0,008	0,007	0,008	0,016	
BS + Gli	0,5	0,005	0,003	0,006	0,010	130,0
	1,0	0,006	0,006	0,009	0,014	
	1,5	0,008	0,007	0,009	0,017	
BS + EL	0,5	0,003	0,004	0,004	0,007	323,0
	1,0	0,002	0,005	0,006	0,009	
	1,5	0,005	0,005	0,008	0,011	
BH	0,5	0,004	0,004	0,009	0,008	110,0
	1,0	0,006	0,006	0,011	0,016	
	1,5	0,010	0,010	0,013	0,020	
BH + Gli	0,5	0,004	0,004	0,006	0,011	247,0
	1,0	0,007	0,007	0,009	0,016	
	1,5	0,009	0,009	0,011	0,018	
BH + EL	0,5	0,003	0,003	0,004	0,009	359,0
	1,0	0,004	0,005	0,006	0,009	
	1,5	0,006	0,008	0,009	0,012	
AM	0,5	0,005	0,004	0,007	0,010	1100,0
	1,0	0,006	0,007	0,010	0,016	
	1,5	0,009	0,008	0,012	0,018	
AM + Gli	0,5	0,003	0,004	0,006	0,009	1275,0
	1,0	0,006	0,006	0,010	0,015	
	1,5	0,008	0,009	0,013	0,021	
AM + EL	0,5	0,003	0,004	0,006	0,009	1386,0
	1,0	0,004	0,005	0,006	0,013	
	1,5	0,005	0,006	0,007	0,014	
MS + Tol	0,5	0,003	0,003	0,005	0,010	0162,0
	1,0	0,005	0,005	0,007	0,013	
	1,5	0,007	0,007	0,008	0,015	
BS + Tol	0,5	0,004	0,003	0,006	0,009	65,0
	1,0	0,005	0,003	0,011	0,016	
	1,5	0,005	0,007	0,012	0,017	
BH + Tol	0,5	0,002	0,002	0,005	0,010	107,0
	1,0	0,006	0,005	0,005	0,015	
	1,5	0,005	0,007	0,007	0,017	
AM + Tol	0,5	0,002	0,001	0,004	0,008	1088,0
	1,0	0,003	0,004	0,006	0,010	
	1,5	0,005	0,007	0,012	0,016	

Os menores valores k_La e os maiores índices de osmolaridade, foram sempre observados nos meios de cultivo contendo extrato de levedura (Tabela 2.2), provavelmente devido à sua conhecida natureza coloidal e de aumento da viscosidade, características essas que tendem a diminuir a solubilidade do oxigênio. De fato, ao comparar os valores médios, o k_La em meios de cultivo não suplementado, sob 300 rpm de agitação e aeração de 1,5 vvm, foi de $0,018 \text{ s}^{-1}$; com extrato de levedura, esta constante se reduziu para $0,012 \text{ s}^{-1}$, manteve-se em $0,018 \text{ s}^{-1}$ para glicose, e se reduziu para $0,016 \text{ s}^{-1}$, no meio contendo tolueno. Essa redução, menos pronunciada, foi exercida pelo tolueno nos meios de baixa salinidade (BS), Bushnell-Haas (BH) e água do mar (AM), provavelmente devido à natureza hidrofóbica deste solvente.

Em todos os casos, a osmolaridade aumentou com a concentração de sal, sendo 4,12; 4,89 e 8,15 vezes maior em meio AM do que nos meios MS, BH e BS, respectivamente. Com efeito, este comportamento pode ser esperado a partir do conhecido efeito de sais sobre a pressão osmótica, a qual é muito mais forte do que a exercida por compostos orgânicos.

A variação dos valores de k_La obtidos no presente estudo (Tabela 2.2), dentro de amplas faixas de agitação e aeração, está de acordo com a verificada por vários autores, com valores entre $0,001$ e $0,020 \text{ s}^{-1}$ (GALACTION et al., 2004; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2004).

2.3.2 Correlações adimensionais para previsão de k_La

Em água destilada, os valores dos expoentes α (0,132) e β (0,506) da Eq. (3) (Tabela 2.3), que representam as inclinações lineares das retas correlacionando $\ln k_La$ para $\ln N^3 D^2$ e $\ln Vs$, respectivamente, estão dentro das amplas escalas de valores relatadas na literatura ($0,1 \leq \alpha \leq 0,7$ e $0,3 \leq \beta \leq 0,8$) em biorreatores de diferentes formatos, sob condições de operação bastante distintas (MARQUES et al., 2009; OZBEK; GAYIK, 2011; PUTHLI et al., 2005). Na verdade, esta diferença pode ocorrer devido ao *design* diferente dos biorreatores, das propriedades do meio de cultivo e das condições de operação realizadas (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2004).

No presente estudo, os valores de α e β em MS, BS, BH e AM suplementados com glicose, extrato de levedura e tolueno foram estatisticamente mais significativos do que os seus respectivos valores na ausência destes

compostos (Tabela 2.3), provavelmente porque a sua presença na fase líquida alterou as propriedades físico-químicas do produto, afetando, então, a transferência de massa de oxigênio (FARHADIAN et al., 2010; JAMNONGWONG et al., 2010; MARQUES et al., 2009). Esses aumentos foram particularmente elevados na presença de tolueno ($\alpha = 0,306$; $0,363$; $0,344$; $0,237$ e $\beta = 0,968$; $0,974$; $1,052$ e $1,506$, para MS, BS, BH e AM, respectivamente), cuja hidrofobicidade pode ter promovido a coalescência de bolhas de ar maiores, diminuindo, assim, a área interfacial (GALACTION et al., 2004; MARQUES et al., 2009). Em contraste, a agitação é bem conhecida por influenciar a distribuição e a mistura de bolhas de ar, de forma que uma agitação insuficiente resulta em baixa transferência de oxigênio, especialmente em meios altamente viscosos (MARQUES et al., 2009).

Tabela 2.3. Correlação de coeficientes α e β estimados para água destilada (A), meio salino (MS), meio de baixa salinidade (BS), meio Bushnell-Haas (BH) e água do mar (AM) na ausência ou na presença de 2% de glicose (Gli), 5% de Extrato de levedura (EL) e 3% de tolueno (Tol) por meio de regressão linear da Eq. (1).

Amostra	α	β	R^2
A	0,132 ^a	0,506 ^a	0,995
MS	0,162 ^b	0,606 ^d	0,969
MS + Gli	0,185 ^d	0,622 ^e	0,979
MS + EL	0,301 ^l	0,654 ^k	0,988
MS + Tol	0,306 ^m	0,968 ^m	0,979
BS	0,195 ^f	0,869 ⁱ	0,997
BS + Gli	0,230 ⁱ	0,879 ^k	0,981
BS + EL	0,245 ^k	0,892 ^l	0,985
BS + Tol	0,363 ^o	0,974 ^m	0,989
BH	0,173 ^c	0,510 ^b	0,966
BH + Gli	0,200 ^g	0,697 ^d	0,998
BH + EL	0,208 ^h	0,771 ^h	0,991
BH + Tol	0,344 ⁿ	1,052 ⁿ	0,987
AM	0,179 ^d	0,545 ^c	0,968
AM + Gli	0,178 ^d	0,802 ⁱ	0,989
AM + EL	0,193 ^f	0,877 ^k	0,998
AM + Tol	0,237 ^j	1,056 ⁿ	0,988

2.3.3 Efeito da surfactina e do tolueno na tensão superficial dos diferentes meios de cultivo

Os experimentos realizados mostram a influência simultânea da presença de tolueno e da concentração de surfactina na tensão superficial (TS) dos meios de cultivo estudados. Tomando-se como referência a água destilada (Figura 2.1), ocorreu aumento progressivo na concentração de surfactina, o qual levou à

diminuição correspondente da TS, como resultado de uma provável formação de micelas. Quando o tolueno foi adicionado, houve maior dispersão do óleo no meio aquoso, na medida em que houve aumento da concentração de surfactina, provocando, assim, maior diminuição da TS.

Figura 2.1. Valores de tensão superficial em água destilada (A) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações (µg/L): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

O mesmo procedimento foi realizado nos diferentes meios salinos, para que se fosse avaliada a influência da salinidade na ação da surfactina, exceto em meio MS, o qual apresentou resultados inferiores ao meio BH. Segundo Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008), o estudo do efeito da salinidade sobre a atividade do biossurfactante se faz necessário para se investigar sua possível aplicação em biorremediação de ambientes marinhos contaminados.

Nos ensaios, observou-se que a presença de sal interfere na interação biossurfactante-hidrocarboneto. Mesmo no meio BS (11 mOsmol/L) com baixa salinidade, houve aumento da TS a partir de 50 µg/µL de surfactina nas amostras com a presença de tolueno, em relação ao início do teste (Figura 2.2).

Figura 2.2. Valores de tensão superficial em meio de baixa salinidade (BS, 11 mOsmol/L) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações ($\mu\text{g/L}$): $\square$ 0; $\blacksquare$ 5; $\blacksquare$ 10; $\blacksquare$ 50; $\blacksquare$ 100; $\blacksquare$ 200; $\blacksquare$ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

Enquanto o meio BS se comportou de forma praticamente idêntica à água destilada, o meio BH (110 mOsmol/L) apresentou TS substancialmente maior em todas as condições testadas (Figura 2.3). Por exemplo, depois de 48 horas, na presença de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de surfactina e 3% de tolueno, a TS (35,6 mN/m) foi aproximadamente 55% mais elevada do que em água destilada. Como sugerido por Hanna et al. (2005), a presença de sal na solução favorece a formação de mais micelas e de tamanhos maiores que se agregam verticalmente como uma haste, encapsulando mais moléculas de hidrocarboneto. Esta capacidade de melhor agregação do surfactante foi confirmada por Zhai et al. (2006), que observaram que, na ausência de sais, ocorre a simples formação de micelas esféricas, enquanto na presença de sais formam-se vesículas, que são agregados maiores, mesmo em baixas concentrações de biossurfactante.

Figura 2.3. Valores de tensão superficial em meio Bushnell-Haas (BH, 110 mOsmol/L) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações (µg/L): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

O processo de solubilidade dos hidrocarbonetos é afetado pela força iônica ou pela salinidade dos meios. Wang et al. (2007) relataram que a presença de eletrólitos provoca decréscimo da concentração micelar crítica (CMC), momento em que inicia a formação de micelas, com consequente aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos. Além disto, a formação de micelas também pode ser afetada pela geração de compostos complexos entre íons e o surfactante.

A presença de sal no meio pode ter favorecido a dispersão e a solubilização tolueno, e até do aumento da TS depois de 48 horas. Tal fato não ocorreu em BS, particularmente em baixas concentrações de biossurfactante (5 e 10 µg/µL), provavelmente porque a concentração total do sal não foi suficiente para favorecer a formação de micelas sob estas condições. Da mesma forma, Tabatabaee et al. (2005) observaram que, na ausência de sal, a TS diminuiu ao longo do ensaio, enquanto que na presença deste, houve aumento da tensão em conformidade com a concentração salina. Em contrapartida, Haghighat et al. (2008) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de NaCl (2-20%), sobre os biossurfactantes sintetizados por *B. subtilis* e *B. licheniformis*, e descobriram que a presença de sal não influenciou significativamente a TS, mesmo em concentrações elevadas (20%)

A Figura 2.4 mostra os valores de TS detectados em AM. Deve-se salientar que, no final dos ensaios, o meio AM exibiu a TS 8% maior do que a do meio BS, na presença de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de surfactina e 3% de tolueno. De acordo com Abdel-Mawgoud et al. (2008), a atividade da surfactina permanece praticamente constante até 6% de concentração de NaCl, valor que é aproximadamente o dobro da água do mar (cerca de 3%). Assim, os resultados observados em AM podem ser explicados pelo aumento da solubilização do tolueno, devido à formação de vesículas em vez de micelas, na presença de sais (ZHAH et al., 2006). Com a solubilização facilitada do tolueno pelas vesículas, podem ter restado monômeros de biossurfactante que reduziram a tensão superficial (URUM; PEKDEMIR, 2004).

Figura 2.4. Valores de tensão superficial em água do mar (AM, 1110 mOsmol/L) com adição ou sem adição de 3% de tolueno, na presença de surfactina nas diferentes concentrações ($\mu\text{g}/\text{L}$): $\square$ 0; $\square$ 5; $\square$ 10; $\square$ 50; $\square$ 100; $\blacksquare$ 200; $\blacksquare$ 500. Média dos valores ($n = 3$) $\pm$ desvio-padrão determinado no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 48$ h). Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

Em suma, as maiores remoções de tolueno por parte do biossurfactante, correspondentes aos menores valores de TS, ocorreram em todos os ensaios com a maior concentração de surfactina (500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), em todos os meios testados, especificamente: a) água destilada, 23,6 mN/m, b) meio de baixa salinidade, 24,4 mN/m, c) meio Bushnell-Haas, 31,4 mN/m e d) a água do mar, de 25,6 mN/m.

2.4. CONCLUSÃO

Neste estudo, foram comparados os valores de k_La em diferentes soluções a serem utilizadas como possíveis meios de cultura para processos de biorremediação aeróbica, denominados meio salino básico, meio de baixa salinidade, meio Bushnell-Haas e meio simulando água do mar. As melhores condições de operação foram com 300 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração, nas quais os valores máximos de k_La foram encontrados. Sob estas condições, os valores mais baixos de k_La ocorreram nos meios contendo extrato de levedura ($0,012 \text{ s}^{-1}$). A adição de sal aumentou a osmolaridade, enquanto a TS diminuiu quando surfactina foi adicionada aos meios contendo tolueno. A presença de tolueno proporcionou maiores valores dos expoentes da equação que relaciona k_La com o número de potência (α) e a velocidade superficial (β) em todos os meios, se comparados com aqueles contendo glicose ou extrato de levedura. Os resultados obtidos neste estudo preliminar, utilizando tolueno como um modelo de contaminante podem ser usados como ponto de partida para futuros estudos sobre o tratamento de vazamentos de petróleo por microrganismos que degradam hidrocarbonetos, através da produção de biossurfactante, e sugerem que condições de funcionamento ótimas devem ser pesquisadas a fim de aumentar a eficiência da biorremediação.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DE TOLUENO E SALINIDADE SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus*: AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO AGITADOR ROTATIVO PARA BIORREATOR DE BANCADA

3.1. INTRODUÇÃO

As preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas pelo petróleo e seus derivados vêm aumentando gradativamente. As origens de contaminação são diversas: acidentes no transporte de combustíveis por navios e caminhões; vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneos, como de postos de combustíveis, os quais estão sujeitos a corrosões; extração e operações de processamento de petróleo; e liberação inadequada dos resíduos oleosos gerados pelas indústrias que utilizam os derivados de petróleo na produção de plástico, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos (EPA, 2008; LIN et al., 2012).

Essas indústrias geram resíduos como óleos, gorduras, sólidos, compostos orgânicos e metais. Dentre os compostos orgânicos, se destacam: alcanos, cicloalcanos, benzeno, tolueno, xileno, fenol e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (DI MARTINO; LÓPEZ; IUSTMAN, 2012). Que são considerados extremamente poluentes, pois, além de serem tóxicos, apresentam potencial carcinogênico e mutagênico para seres humanos (JANBANDHU; FULEKAR, 2011).

O ambiente marinho tem sofrido constantes derramamentos de óleo, fazendo do petróleo um dos mais abundantes contaminantes orgânicos do mar (OESP, 2000 a 2013). O vazamento de milhares de toneladas de petróleo contaminando a água do mar tem sido constantemente relatados pela mídia: no Brasil, um dos derramamentos mais impactantes ocorreu em novembro de 2011, quando houve um grande vazamento de petróleo da plataforma Sedco 706, operada pela Chevron na Bacia de Campos (Rio de Janeiro), equivalente a 594,3 mil litros, atingindo cerca de 163 Km² (THOMÉ, 2011).

A gasolina e o diesel possuem hidrocarbonetos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) em sua composição, que são os primeiros a chegar a águas subterrâneas, devido à sua alta solubilidade em água (MARIANO, 2007). Por

consequência, estes compostos altamente tóxicos (exceto etilbenzeno) são os maiores causadores de morte por toxicidade (DI MARTINO; LÓPEZ; IUSTMAN, 2012).

Fellenberg (1980) já havia descrito que o petróleo e seus derivados, quando em contato com a água, se espalham, formando uma fina película sobre a superfície que impede a troca de gases entre o ar e a água e também impede a chegada de luz ao fitoplâncton, comprometendo a cadeia alimentar. Confirmando esta teoria, Asimiea e Sam-Wobo (2011) observaram o impacto de resíduos de hidrocarbonetos sobre comunidades de fitoplâncton, que sofreram mudanças estruturais devido à presença destes compostos.

A ameaça potencial dos hidrocarbonetos à saúde humana está ligada às suas propriedades físico-químicas, que permitem que estes compostos sejam absorvidos pela pele, se ingeridos ou inalados, e se espalhem rapidamente por todo o organismo (COSTA et al., 2012).

O tolueno apresenta toxicidade sistêmica moderada para os seres humanos. Quando ingerido, o tolueno é absorvido completamente pelo trato gastrointestinal e rapidamente se distribui pelo corpo, principalmente nos tecidos adiposos, sendo metabolizado e excretado pela urina. Quando inalado, este hidrocarboneto compromete o sistema nervoso central, podendo causar excitação ou depressão, com euforia na fase de indução e, posteriormente, desorientação, tremores, desânimo, alucinações, convulsões e coma; pode provocar alterações eletrolíticas, acidose metabólica, arritmias cardíacas e fraqueza muscular. O tolueno também causa irritação nas mucosas, além de anomalias transitórias nas atividades enzimáticas no fígado e problemas renais (ASIMIEA E SAM-WOBO, 2011; ZHANG et al., 2013). Ademais, efeitos embriotóxicos e fetotóxicos têm sido observados, mas não há nenhuma evidência clara de atividade teratogênica ou carcinogênica em animais de laboratório ou humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Em vista dos problemas causados pelos hidrocarbonetos, tanto para o meio ambiente quanto para os seres humanos, a procura por métodos que contribuam na remoção ou na redução destes compostos do meio ambiente tem aumentado. Os métodos para remediação dos ambientes contaminados são baseados em meios químicos, físicos ou biológicos.

Devido aos altos custos dos tratamentos físicos, e o fato de os métodos químicos deixarem substâncias nocivas à biota local, a procura por tecnologias sustentáveis, utilizando compostos naturais biodegradáveis, tem aumentado (LIN et

al., 2012). O processo de biorremediação, baseado na utilização de organismos vivos para uma possível recuperação de locais contaminados por hidrocarbonetos, consiste na decomposição biológica de compostos orgânicos por microrganismos que utilizam estes poluentes como fonte de carbono para obtenção de energia, biodegradando-os em dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (BANAT et al., 2010).

A baixa solubilidade e a hidrofobicidade elevada dos hidrocarbonetos os tornam altamente indisponíveis aos microrganismos. Para que possam degradar os hidrocarbonetos e utilizá-los como fonte de carbono, os microrganismos produzem o chamado biossurfactante (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011).

Os biossurfactantes são surfactantes sintetizados como produtos metabólicos de diferentes microrganismos, principalmente, aeróbicos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, utilizando vários substratos, como carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras, resíduos industriais e agrícolas ou uma mistura destes (PIRÔLLO et al., 2008).

A partir da década de 1990, muitos gêneros de microrganismos foram identificados como degradadores de hidrocarbonetos: *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.*, *Xanthomonas maltophilia*, entre outros (MARIANO, 2007). A partir de então foram encontrados nove grupos de bactérias em amostras de óleo proveniente de reservatórios de petróleo, como, por exemplo: *Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Bacillus*, *Halanaerobium*, *Leuconostoc*, *Marinobacter*, *Streptomyces*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* (SETTE et al., 2007).

As *Pseudomonas* são conhecidas por sua capacidade em produzir grandes quantidades de glicolipídeos. Estes biossurfactantes produzidos são classificados como ramnolipídeos, capazes de reduzir a tensão superficial da água a valores entre 25 e 30 mN/m, com CMC (concentração micelar crítica) entre 10 e 230 mg/L, dependendo das diferentes fontes microbianas, das condições de pH e da salinidade do meio (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011).

Outro microrganismo amplamente estudado quanto à produção de biossurfactantes é o *Bacillus subtilis*, conhecido por sua eficiência comprovada na produção de um lipopeptídeo com atividade superficial, denominado surfactina ou subtilisina, um dos biossurfactantes mais potentes que se tem conhecimento,

reduzindo a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com CMC em água de 24 mM (AL-BAHRY et al., 2012; DESAI; BANAT, 1997).

Devido aos ótimos resultados obtidos com surfactina, tem-se estudado a produção de biossurfactantes por outras espécies de *Bacillus*. Em 1990, Horowitz, Gilbert e Griffin escreveram sobre a produção de um novo biossurfactante por *Bacillus licheniformis*, denominado lichenisina, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 28 mM, com CMC menor ou igual a 12mM, enquanto a surfactina de *Bacillus subtilis* necessita de 24mM para reduzi-la a 27 mN/m (AL-BAHRY et al., 2012).

Estudos recentes revelam que algumas cepas de *Bacillus megatherium* também produzem biossurfactantes, classificados como glicolípideos (THAVASI; BANAT; JAYALAKSHMI, 2010) ou lipopeptídeos, com capacidade de reduzir a tensão superficial da água para 28-30 mN/m, com CMC de aproximadamente 100 mg/L (PUEYO et al., 2009).

Os biossurfactantes compreendem diferentes estruturas e composições químicas, que variam dependendo do microrganismo que o produz, dos nutrientes do meio de cultura e das condições de cultivo. Consistem principalmente de ácidos graxos, glicolípideos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Estes tensoativos bloqueiam a formação de pontes de hidrogênio e de certas interações hidrofóbicas-hidrofílicas, que causam o remanejamento molecular e reduzem a tensão superficial do líquido (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011). Por conseguinte, a produção de biossurfactante é avaliada, indiretamente, por meio de tensão superficial que, segundo Pirôllo et al. (2008), está relacionada com as forças de atração e repulsão entre as moléculas de um fluido. Para se manterem coesas na superfície líquida, as moléculas exercem uma força de atração intermolecular forte sobre as moléculas mais próximas da superfície, denominada tensão superficial. Assim, os líquidos tendem a diminuir sua área de superfície, formando gotas esféricas que apresentam menor razão superfície/volume.

A eficiência do biossurfactante é determinada através da concentração micelar crítica (CMC), ponto no qual começam a se formar as micelas. Com a formação de micelas, ocorre a redução da tensão superficial e interfacial, devido à diminuição da força de repulsão entre as fases dos fluidos imiscíveis, aumentando a

solubilidade e a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2010).

Quando a concentração de surfactante está abaixo da CMC, os monômeros de surfactante se encontram relativamente organizados na superfície do líquido em equilíbrio dinâmico com os monômeros no interior da solução. Quando a solução atinge a saturação, as moléculas do surfactante buscam uma organização, de modo a diminuir a energia livre do sistema. É nesse ponto que ocorre a formação dos agregados (PRIEBE et al., 2012).

Quando os monômeros de biossurfactante se agregam em uma micela, forma-se, na parte hidrofílica que faz interface com a água, uma dupla camada elétrica que a circunda (camada de Stern). A presença de sal na solução provoca a diminuição das forças de repulsão eletrostáticas presentes nesta camada, permitindo a aproximação da parte polar que favorece a micelização do biossurfactante no sentido vertical, como uma haste, altamente flexível e sem-fim, como agregados de micelas (HANNA et al., 2005). Segundo Rosen (2004), a presença de sais pode alterar o tamanho e a interface micelar. Em baixas concentrações de eletrólitos, ocorre a formação de micelas esféricas; já em meios com maior concentração salina, o número de agregação cresce acentuadamente, com o aumento da concentração de surfactante, resultando em formação de micelas cilíndricas e fases lamelares. Para Candau e Oda (2001), micelas esféricas podem ser morfológicamente induzidas às micelas cilíndricas (vesículas ou lamelas), através da redução da área do grupo polar do surfactante ocasionada pela adição de sal. Zhai et al. (2006) confirmaram que o aumento da salinidade promoveu maior agregação dos monômeros de surfactante, formando vesículas, necessitando de menor concentração de biossurfactante para tanto.

Zeng et al. (2007) fizeram uma ótima observação, quando relataram que muitos estudos têm descrito a produção e a atividade dos surfactantes sobre a tensão superficial dos meios com compostos hidrofóbicos; no entanto, seus efeitos sobre a aceleração ou a facilidade de biodegradação não foram confirmados nem a biossíntese destes compostos por microrganismos, no meio ambiente, foi realmente investigada. Segundo Garcia et al. (2006), a biodegradação dos compostos tensoativos acontece quando os microrganismos os utilizam como fonte de carbono e energia. Neste processo, primeiramente ocorre a quebra da cadeia de hidrocarbonetos, promovendo modificação estrutural e perda imediata da

anfipaticidade; posteriormente, os produtos resultantes da primeira degradação são convertidos em CO₂, água e minerais.

A formação e o acúmulo de biossurfactante estão relacionados a uma série de parâmetros que, segundo Mukherjee, Das e Sem (2006), necessitam de mais estudos, a fim de se atingir maior rendimento da produção de tais compostos, com custos mais baixos. O futuro promissor dos biossurfactante depende do uso de matérias-primas de baixo custo e da otimização das condições de cultivo para aumentar sua produção.

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar a eficiência dos biossurfactante obtidos durante o desenvolvimento de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas putida* na biorremediação de meios aquosos com diferentes salinidades, contaminados por tolueno (utilizado como única fonte de carbono); permitindo, assim, analisar efeitos da salinidade dos meios estudados na ação dos compostos tensoativos sobre o hidrocarboneto.

Para tanto, os meios salinos foram classificados como: de baixa salinidade (BS); meio Bushnell-Haas (BH); e água do mar artificial (AM). Estes meios foram comparados quanto à equivalência dos níveis de biossurfactante obtidos, e de hidrocarboneto consumido, durante o desenvolvimento das bactérias estudadas.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Meios de crescimento

Os meios salinos utilizados neste estudo apresentaram adição ou não de 3% de tolueno. O meio de baixa salinidade (BS, 11 mOsmol/L) foi preparado na proporção de 1:10 (v/v) de meio Bushnell-Haas e água destilada. O meio Bushnell-Haas (BH, 110 mOsmol/L) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) foi preparado de acordo com o fabricante. Este meio de cultura apresenta os seguintes componentes (g/L): Sulfato de Magnésio (0,2), Cloreto de Cálcio (0,02), Fosfato de Potássio Monobásico (1,0), Fosfato de Potássio Dibásico (1,0), Nitrato de Amônio (1,0) e Cloreto Férrico (0,05). A água do mar artificial (AM, 1100 mOsmol/L) foi preparada conforme a formulação adaptada de Bidwell & Spotte (1985), cujos sais são classificados em macroelementos e microelementos, sendo a composição (g/L): Cloreto de Cálcio (27,6), Sulfato de Magnésio (6,9), Cloreto de Magnésio (5,4), Cloreto de Cálcio (1,4), Cloreto de Potássio (0,6), Bicarbonato de Sódio (0,2), Brometo de Potássio (0,027), Cloreto de Estrôncio (0,02), Sulfato de Manganês (0,004), Fosfato de Sódio (0,004) e Molibdato de Sódio (0,001).

3.2.2. Microrganismos

As bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Bacillus megatherium* (ATCC 14581), *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580) foram estudadas para verificar a biodegradação de tolueno nos meios aquosos. *Pseudomonas putida* (ATCC 12633) foi utilizada com propósito comparativo. Todas as cepas foram adquiridas da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil) e armazenadas, até serem utilizadas, a -80°C em meio BH com 5% de extrato de levedura e 50% (v/v) de glicerol em pH 7,0.

3.2.3. Crescimento bacteriano em agitador rotativo

As pré-culturas foram preparadas, utilizando 1.000 µL da cepa armazenada, transferidos para 15 mL de meio BH, com 5% de extrato de levedura, e incubadas a 30°C e 200 rpm em agitador rotativo (New Brunswick, modelo G 25KC) durante 24h. Após este processo, 2% de inóculo foram transferidos em tubos de ensaio contendo 20 mL dos meios salinos, descritos na seção 3.2.1, usados para ensaios realizados em agitador rotativo nas seguintes condições de processo: 200 rpm; 30°C; e 96h. A

seguir, em tempos determinados (48, 72 e 96 horas), foram mediadas a produção de biossurfactantes e a concentração de biomassa.

3.2.4. Fermentação para produção de biossurfactante em biorreator

A partir dos testes em agitador rotativo, a bactéria que apresentou melhor desempenho na produção de biossurfactante foi selecionada. Os ensaios foram realizados em biorreator de bancada New Brunswick, modelo BioFlo[®]/Celligen[®] 115, com 2% de inóculo, contendo 1,5 L dos meios salinos, descritos na seção 3.2.1, e 3% de tolueno. Pré-culturas foram colhidas em condições semelhantes às descritas anteriormente (seção 3.2.3). As condições de cultivo foram 30 °C de temperatura, 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração, por 42h. A tensão superficial (indicando a produção de biossurfactante) e a quantidade de biomassa celular foram avaliadas durante o processo fermentativo.

3.2.5. Determinação celular

O crescimento bacteriano foi medido por peso seco e determinado pela filtração de 5 mL das amostras, através de membranas de filtração (Millipore, 0,45 µm) previamente secas e pesadas. Em seguida, as membranas foram secas em estufa a 100°C por 24h.

3.2.6. Determinação de biossurfactante

Amostras foram colhidas em determinados tempos de cultivo (0, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 39 e 42 horas) e a produção de biossurfactante foi avaliada através da medição da tensão superficial (TS) do meio de cultura, utilizando o método do anel em tensiômetro modelo Krüss - K9-Mk1 (Hamburgo, Alemanha), à temperatura ambiente. A concentração de biossurfactante [BSF] foi calculada usando a curva de calibração descrita por Rodríguez-Pazo et al. (2013): $[BSF] \text{ (mg/L)} = (TS \text{ (mN/m)} - 76,984) / -8,64658$, que foi obtida com surfactina em diferentes concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC), com valores conhecidos de TS.

3.2.7. Análise de hidrocarboneto por cromatografia gasosa (CG)

Este teste foi realizado no Setor Técnico de Tratamento de Resíduos Químicos e Solventes, do Instituto de Química (USP), no laboratório de análises cromatográficas.

Inicialmente, a extração do tolueno foi realizada, utilizando-se 1:3 (amostra:clorofórmio), sendo o extrato em clorofórmio injetado (0,5 μL) em cromatógrafo a gás Agilent (modelo 7820A). A análise da presença de tolueno foi realizada em coluna HP-5 (5% fenil metilsilicone), espessura: 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm (Agilent Technologies). Seguindo as condições: temperatura inicial 40°C por 1 minuto e rampa de aquecimento 10°C min^{-1} até 80°C, permanecendo por 1 minuto. Composição da chama (300/30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$): ar sintético: Hidrogênio; gás de arraste: hélio a 28,516 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.3.1. Crescimento de microrganismos em agitador rotativo e produção de biossurfactante

Ensaio preliminares foram conduzidos em agitador rotativo, a fim de selecionar, entre as diferentes estirpes de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megatherium* e *B. licheniformis*), a bactéria com maior tolerância ao tolueno, uma vez que este composto foi utilizado com única fonte de carbono. Para esta finalidade, as bactérias selecionadas foram cultivadas em meio de cultura à base de tolueno, utilizando diferentes salinidades, ou na ausência deste hidrocarboneto. Adicionalmente, *P. putida* foi utilizada para comparação, considerando que este microrganismo tem sido amplamente estudado devido à sua alta capacidade de produção de biossurfactante (APARNA; SRINIKETHAN; HEDGE, 2011).

A concentração de biomassa dos microrganismos estudados variou de $0,08 \pm 0,01$ a $1,32 \pm 0,01$ g/L, em todos os meios de cultivo avaliados neste estudo. Utilizando o meio de baixa salinidade (BS), a cepa *B. licheniformis* apresentou melhor crescimento no meio de cultura elaborado sem a presença do tolueno, atingindo $0,82 \pm 0,02$ g/L depois de 96h de cultivo. Por outro lado, a presença de tolueno foi prejudicial para todos os microrganismos, reduzindo consideravelmente os resultados obtidos. Com exceção da *P. putida*, *B. subtilis* mostrou melhor crescimento, embora a concentração celular tenha reduzido para apenas $0,16 \pm 0,02$ g/L (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Crescimento microbiano de diferentes cepas em meio de baixa salinidade (BS) na ausência ou na presença de tolueno. Média dos valores (n=3) $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

BS	Microrganismo	Tempo (h)	Biomassa (g/L)
Sem Tolueno	<i>Bacillus subtilis</i>	48	0,11 $\pm$ 0,01 ^a
	<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,24 $\pm$ 0,01 ^e
	<i>Bacillus subtilis</i>	96	0,24 $\pm$ 0,02 ^e
	<i>Bacillus licheniformis</i>	48	0,20 $\pm$ 0,02 ^d
	<i>Bacillus licheniformis</i>	72	0,56 $\pm$ 0,01 ^j
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	0,82 $\pm$ 0,02 ^k
	<i>Bacillus megatherium</i>	48	0,28 $\pm$ 0,02 ⁱ
	<i>Bacillus megatherium</i>	72	0,26 $\pm$ 0,03 ^{ef}
	<i>Bacillus megatherium</i>	96	0,34 $\pm$ 0,02 ^{gh}
	<i>Pseudomonas putida</i>	48	0,32 $\pm$ 0,01 ^g
	<i>Pseudomonas putida</i>	72	0,32 $\pm$ 0,01 ^g
	<i>Pseudomonas putida</i>	96	0,36 $\pm$ 0,02 ^h
Com Tolueno	<i>Bacillus subtilis</i>	48	0,16 $\pm$ 0,02 ^c
	<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,16 $\pm$ 0,01 ^c
	<i>Bacillus subtilis</i>	96	0,11 $\pm$ 0,01 ^a
	<i>Bacillus licheniformis</i>	48	0,11 $\pm$ 0,02 ^a
	<i>Bacillus licheniformis</i>	72	0,12 $\pm$ 0,03 ^{ab}
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	0,11 $\pm$ 0,02 ^a
	<i>Bacillus megatherium</i>	48	0,14 $\pm$ 0,03 ^{bc}
	<i>Bacillus megatherium</i>	72	0,12 $\pm$ 0,03 ^{ab}
	<i>Bacillus megatherium</i>	96	0,14 $\pm$ 0,02 ^{bc}
	<i>Pseudomonas putida</i>	48	0,48 $\pm$ 0,02 ⁱ
	<i>Pseudomonas putida</i>	72	0,12 $\pm$ 0,02 ^{ab}
	<i>Pseudomonas putida</i>	96	0,28 $\pm$ 0,01 ^f

De forma geral, em relação à utilização do meio de salinidade intermediária, o meio Bushnell-Haas (BH) se mostrou positivo para todos os microrganismos sob todas as condições avaliadas, melhorando consideravelmente os resultados no que diz respeito ao uso do meio BS. Assim, na ausência de tolueno, o melhor crescimento foi obtido novamente usando *B. licheniformis*; neste caso, produzindo $0,60 \pm 0,03$ g/L após 48h de fermentação (Tabela 3.2). Contudo, na presença de tolueno, o melhor resultado em termos de ganho de biomassa foi obtido com *B. megatherium* ($0,52 \pm 0,01$ g/L após 48 h); entretanto este valor foi reduzido a $0,08 \pm 0,02$ g/L após 96 h.

Tabela 3.2. Crescimento microbiano de diferentes cepas em meio Bushnell-Haas (BH) na ausência ou na presença de tolueno. Média dos valores (n=3) $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

BH	Microrganismo	Tempo (h)	Biomassa (g/L)
Sem Tolueno	<i>Bacillus subtilis</i>	48	0,20 $\pm$ 0,02 ^j
	<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,28 $\pm$ 0,01 ⁱ
	<i>Bacillus subtilis</i>	96	0,26 $\pm$ 0,01 ^h
	<i>Bacillus licheniformis</i>	48	0,60 $\pm$ 0,03 ^p
	<i>Bacillus licheniformis</i>	72	0,62 $\pm$ 0,03 ^q
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	0,35 $\pm$ 0,02 ^l
	<i>Bacillus megatherium</i>	48	0,48 $\pm$ 0,01 ⁿ
	<i>Bacillus megatherium</i>	72	0,60 $\pm$ 0,02 ^p
	<i>Bacillus megatherium</i>	96	0,32 $\pm$ 0,01 ^k
	<i>Pseudomonas putida</i>	48	0,60 $\pm$ 0,02 ^p
	<i>Pseudomonas putida</i>	72	1,01 $\pm$ 0,02 ^r
	<i>Pseudomonas putida</i>	96	0,36 $\pm$ 0,02 ^l
Com Tolueno	<i>Bacillus subtilis</i>	48	0,08 $\pm$ 0,01 ^a
	<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,14 $\pm$ 0,01 ^c
	<i>Bacillus subtilis</i>	96	0,10 $\pm$ 0,01 ^b
	<i>Bacillus licheniformis</i>	48	0,46 $\pm$ 0,03 ^m
	<i>Bacillus licheniformis</i>	72	0,26 $\pm$ 0,02 ^h
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	0,16 $\pm$ 0,03 ^d
	<i>Bacillus megatherium</i>	48	0,52 $\pm$ 0,01 ^o
	<i>Bacillus megatherium</i>	72	0,22 $\pm$ 0,01 ^g
	<i>Bacillus megatherium</i>	96	0,08 $\pm$ 0,02 ^a
	<i>Pseudomonas putida</i>	48	0,35 $\pm$ 0,03 ⁱ
	<i>Pseudomonas putida</i>	72	0,30 $\pm$ 0,03 ^j
	<i>Pseudomonas putida</i>	96	0,18 $\pm$ 0,01 ^e

Finalmente, utilizando água do mar artificial (AM) e, consequentemente, com a maior quantidade de sal, as cepas de *B. subtilis* e *B. licheniformis* apresentaram os melhores resultados, no que diz respeito à biomassa, na ausência de tolueno (0,80 $\pm$ 0,03 g/L e 0,76 $\pm$ 0,01 g/L, respectivamente). Porém, estes valores foram obtidos após longo tempo de cultivo; ou seja, 72h, sugerindo que os microrganismos necessitam de período de adaptação sob maior concentração de sal. Quanto ao uso de meios de cultura formulados com tolueno, o *B. subtilis* apresentou comportamento um pouco melhor, com média de crescimento celular de 0,38 g/L durante todo o processo fermentativo, sendo, assim, a cepa mais estável sob condições extremas de salinidade (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Crescimento microbiano de diferentes cepas em água do mar (AM) na ausência ou na presença de tolueno. Média dos valores (n=3) $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna significam que há diferença estatística entre os valores ($P < 0,05$).

AM	Microrganismo	Tempo (h)	Biomassa (g/L)
Sem Tolueno	<i>Bacillus subtilis</i>	48	0,52 $\pm$ 0,03 ⁱ
	<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,80 $\pm$ 0,03 ⁿ
	<i>Bacillus subtilis</i>	96	0,40 $\pm$ 0,03 ^f
	<i>Bacillus licheniformis</i>	48	0,28 $\pm$ 0,02 ^b
	<i>Bacillus licheniformis</i>	72	0,76 $\pm$ 0,01 ^m
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	0,28 $\pm$ 0,02 ^b
	<i>Bacillus megatherium</i>	48	0,20 $\pm$ 0,02 ^a
	<i>Bacillus megatherium</i>	72	0,44 $\pm$ 0,02 ^h
	<i>Bacillus megatherium</i>	96	0,32 $\pm$ 0,03 ^d
	<i>Pseudomonas putida</i>	48	1,32 $\pm$ 0,01 ^q
	<i>Pseudomonas putida</i>	72	0,62 $\pm$ 0,01 ^k
	<i>Pseudomonas putida</i>	96	0,72 $\pm$ 0,03 ^j
Com Tolueno	<i>Bacillus subtilis</i>	48	0,34 $\pm$ 0,03 ^e
	<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,40 $\pm$ 0,02 ^f
	<i>Bacillus subtilis</i>	96	0,40 $\pm$ 0,02 ^f
	<i>Bacillus licheniformis</i>	48	0,28 $\pm$ 0,02 ^b
	<i>Bacillus licheniformis</i>	72	0,30 $\pm$ 0,01 ^c
	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	0,28 $\pm$ 0,01 ^b
	<i>Bacillus megatherium</i>	48	0,30 $\pm$ 0,02 ^c
	<i>Bacillus megatherium</i>	72	0,54 $\pm$ 0,02 ^j
	<i>Bacillus megatherium</i>	96	0,28 $\pm$ 0,03 ^b
	<i>Pseudomonas putida</i>	48	1,02 $\pm$ 0,01 ^p
	<i>Pseudomonas putida</i>	72	0,42 $\pm$ 0,01 ^g
	<i>Pseudomonas putida</i>	96	0,82 $\pm$ 0,02 ^o

Através dos resultados do crescimento celular obtidos nos experimentos realizados em agitador rotativo, e tendo em vista o aumento da escala para biorreator, o *B. subtilis* pode ser considerado o microrganismo mais apropriado a ser desenvolvido em meio de cultura contendo tolueno, uma vez que as concentrações médias de biomassa foram de 0,14, 0,11 e 0,38 g/L, obtidas nos meios de crescimento BS, BH e AM, respectivamente. Além disto, esta cepa apresentou melhor crescimento celular entre todos os microrganismos avaliados neste estudo, com a exceção de *B. licheniformis*, em BH (0,29 $\pm$ 0,02 g/L), e *P. putida* (0,75 $\pm$ 0,01 g/L) em meio AM.

No que diz respeito à capacidade destes microrganismos em produzir biossurfactantes, o comportamento depende da presença de tolueno, considerando os valores de tensão TS plotados na Figura 3.1 e a quantidade de biossurfactante (em mg/L) expresso como biosurfactina equivalente, compilados na Tabela 3.4 (na ausência de tolueno) e na Tabela 3.5 (na presença de tolueno).

Figura 3.1. Valores de Tensão Superficial em meio BS, BH, AM com ou sem tolueno, usando *Bacillus licheniformis* (□), *Bacillus megatherium* (○), *Bacillus subtilis* (◇) e *Pseudomonas putida* (△) como microrganismos produtores de biossurfactante em diferentes tempos de fermentação (48, 72 e 96h). Valores médios ($n = 3$) $\pm$ desvios padrão com letras diferentes na mesma coluna, mostrando que elas se diferem significativamente entre os valores do mesmo parâmetro ($P < 0,05$).

Na presença de tolueno, observa-se que a TS foi mais baixa em todas as amostras, se comparadas com as amostras sem tolueno (Figura 3.1). Segundo Vaz et al. (2012), o decréscimo da tensão superficial evidencia a produção de biossurfactante. Sendo assim, o uso de tolueno com fonte de carbono estimulou significativamente a produção de biossurfactante por todos os microrganismos testados, independentemente do grau de salinidade.

Uma substância pode ser considerada surfactante quando for capaz de reduzir a TS em pelo menos 8 unidades (VAN DER VEGT et al., 1991). Desta forma, na ausência de tolueno, as reduções de TS apresentadas na Tabela 3.4 indicam que apenas o *B. subtilis* em meio BS foi capaz de reduzir a TS em $8,45 \pm 0,49$ unidades após 72h ($1,32 \pm 0,06$ mg/L) e $13,05 \pm 0,07$ unidades em AM após 96h ($1,85 \pm 0,01$ mg/L). O *B. licheniformis* reduziu a TS em mais de 8 unidades em meio BS ($11,85 \pm 0,35$ unidades) após 48 h, atingindo $1,72 \pm 0,04$ mg/L de biossurfactante. Apesar de *B. subtilis* ter apresentado menor média de crescimento celular em meio BS ($0,11 \pm 0,01$ g/L após 48 h e $0,24 \pm 0,02$ após 96 h, de acordo com os dados mostrados na Tabela 3.4), esta cepa foi capaz de reduzir a TS abaixo da obtida com *B. megatherium* e *B. licheniformis*. De acordo com Desai e Banat (1997), os biossurfactantes eficientes têm baixa CMC, isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para reduzir a TS, demonstrando que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* foi mais eficiente que o produzido pelas outras cepas testadas. Por outro lado, a cepa *P. putida* (usada para comparação) foi o microrganismo que melhor se desenvolveu, reduzindo consideravelmente a TS em quase todos os casos considerados. A maior redução ($21,25 \pm 1,06$ unidades) foi alcançada em meio BS após 72 h, produzindo $2,80 \pm 0,12$ mg/L de biossurfactante. Estes valores diminuíram com o aumento da salinidade, com redução de $16,45 \pm 0,49$ e $11,80 \pm 0,28$ unidades em meio BH e AM, respectivamente.

Por outro lado, o uso de tolueno com fonte de carbono estimulou significativamente a produção de biossurfactante em curtos períodos de tempo. Assim, todos os microrganismos testados, independentemente do grau de salinidade, reduziram a TS em valores superiores a 19 unidades em apenas 48 horas. O que se pode concluir é que, na ausência de tolueno, o crescimento microbiano é estimulado, mas na presença de tolueno, o metabolismo bacteriano se desloca para a produção de biossurfactante, em vez de utilizar sua energia para o crescimento celular.

Tabela 3.4. Crescimento bacteriano em meios de baixa salinidade (BS), Bushnell-Haas (BH) e água do mar artificial (AM) na ausência de tolueno.

Cepa	Tempo (h)	BS			BH			AM		
		Biomassa (g/L)	BSF (mg/L)	TS _{red}	Biomassa (g/L)	BSF (mg/L)	TS _{red}	Biomassa (g/L)	BSF (mg/L)	TS _{red}
<i>B. subtilis</i>	48	0,11±0,01 ^a	1,00±0,05	5,70±0,40	0,20±0,02 ^f	0,75±0,06	3,54±0,51	0,52±0,03 ⁱ	0,77±0,04	3,65±0,35
<i>B. subtilis</i>	72	0,24±0,01 ^e	1,32±0,06	8,45±0,49	0,28±0,01 ⁱ	0,86±0,06	4,45±0,49	0,80±0,03 ⁿ	0,86±0,06	4,45±0,49
<i>B. subtilis</i>	96	0,24±0,02 ^e	0,69±0,07	3,00±0,57	0,26±0,01 ^h	0,41±0,07	0,60±0,57	0,40±0,03 ^f	1,85±0,01	13,05±0,07
<i>B. licheniformis</i>	48	0,20±0,02 ^d	1,72±0,04	11,85±0,35	0,60±0,03 ^p	0,39±0,04	0,35±0,35	0,28±0,02 ^b	0,44±0,02	0,85±0,21
<i>B. licheniformis</i>	72	0,56±0,01 ^j	0,59±0,16	2,07±1,38	0,62±0,03 ^q	0,64±0,04	2,55±0,35	0,76±0,01 ^m	0,39±0,04	0,35±0,35
<i>B. licheniformis</i>	96	0,82±0,02 ^k	0,61±0,12	2,25±1,06	0,35±0,02 ^l	0,42±0,04	0,63±0,32	0,28±0,02 ^b	0,67±0,03	2,80±0,28
<i>B. megatherium</i>	48	0,28±0,02 ^f	0,36±0,02	0,10±0,14	0,48±0,01 ⁿ	0,99±0,04	5,55±0,35	0,20±0,02 ^a	0,65±0,06	2,65±0,49
<i>B. megatherium</i>	72	0,26±0,03 ^{ef}	0,89±0,05	4,70±0,42	0,60±0,02 ^p	0,62±0,05	2,37±0,47	0,44±0,02 ^h	0,54±0,05	1,70±0,42
<i>B. megatherium</i>	96	0,34±0,02 ^{gh}	0,54±0,06	1,65±0,49	0,32±0,01 ^k	0,64±0,06	2,59±0,54	0,32±0,03 ^d	0,53±0,07	1,60±0,57
<i>P. putida</i>	48	0,32±0,01 ^g	1,78±0,10	12,40±0,85	0,60±0,02 ^p	2,25±0,06	16,45±0,49	1,32±0,01 ^q	1,22±0,04	7,55±0,35
<i>P. putida</i>	72	0,32±0,01 ^g	2,80±0,12	21,25±1,06	1,01±0,02 ^f	1,46±0,05	9,63±0,47	0,62±0,01 ^k	1,71±0,03	11,80±0,28
<i>P. putida</i>	96	0,36±0,02 ^h	1,18±0,12	7,25±1,06	0,36±0,02 ^l	1,78±0,05	12,41±0,41	0,72±0,03 ^l	0,78±0,03	3,80±0,28

BSF: Concentração de biossurfactante

TS_{red}: redução da tensão superficial

* Letras diferentes na mesma coluna mostram que elas se diferem significativamente entre os valores do mesmo parâmetro (P < 0,05).

Tabela 3.5. Crescimento bacteriano em meios de baixa salinidade (BS), Bushnell-Haas (BH) e água do mar artificial (AM) na presença de tolueno. Média dos valores (n=3) $\pm$ desvio-padrão.

Cepa	Tempo (h)	BS			BH			AM		
		Biomassa (g/L)	BSF (mg/L)	TS _{red}	Biomassa (g/L)	BSF (mg/L)	TS _{red}	Biomassa (g/L)	BSF (mg/L)	TS _{red}
<i>B. subtilis</i>	48	0,16 $\pm$ 0,02 ^c	3,06 $\pm$ 0,08	23,50 $\pm$ 0,71	0,08 $\pm$ 0,01 ^a	2,72 $\pm$ 0,08	20,53 $\pm$ 0,67	0,34 $\pm$ 0,03 ^e	2,85 $\pm$ 0,05	21,70 $\pm$ 0,42
<i>B. subtilis</i>	72	0,16 $\pm$ 0,01 ^c	3,06 $\pm$ 0,08	23,50 $\pm$ 0,71	0,14 $\pm$ 0,01 ^c	3,50 $\pm$ 0,04	27,26 $\pm$ 0,35	0,40 $\pm$ 0,02 ^f	2,73 $\pm$ 0,03	20,60 $\pm$ 0,28
<i>B. subtilis</i>	96	0,11 $\pm$ 0,01 ^a	2,93 $\pm$ 0,06	22,35 $\pm$ 0,49	0,10 $\pm$ 0,01 ^b	3,52 $\pm$ 0,06	27,49 $\pm$ 0,55	0,40 $\pm$ 0,02 ^f	3,05 $\pm$ 0,03	23,40 $\pm$ 0,28
<i>B. licheniformis</i>	48	0,11 $\pm$ 0,02 ^a	3,19 $\pm$ 0,07	24,60 $\pm$ 0,57	0,46 $\pm$ 0,03 ^m	3,18 $\pm$ 0,07	24,53 $\pm$ 0,60	0,28 $\pm$ 0,02 ^b	2,63 $\pm$ 0,04	19,75 $\pm$ 0,35
<i>B. licheniformis</i>	72	0,12 $\pm$ 0,03 ^{ab}	3,05 $\pm$ 0,06	23,35 $\pm$ 0,49	0,26 $\pm$ 0,02 ^h	3,18 $\pm$ 0,06	24,55 $\pm$ 0,49	0,30 $\pm$ 0,01 ^c	2,62 $\pm$ 0,05	19,70 $\pm$ 0,42
<i>B. licheniformis</i>	96	0,11 $\pm$ 0,02 ^a	2,91 $\pm$ 0,13	22,20 $\pm$ 1,13	0,16 $\pm$ 0,03 ^d	1,81 $\pm$ 0,04	12,63 $\pm$ 0,33	0,28 $\pm$ 0,01 ^b	2,38 $\pm$ 0,07	17,60 $\pm$ 0,57
<i>B. megatherium</i>	48	0,14 $\pm$ 0,03 ^{bc}	2,61 $\pm$ 0,07	19,55 $\pm$ 0,64	0,52 $\pm$ 0,01 ^o	2,72 $\pm$ 0,07	20,50 $\pm$ 0,57	0,30 $\pm$ 0,02 ^c	2,74 $\pm$ 0,04	20,75 $\pm$ 0,35
<i>B. megatherium</i>	72	0,12 $\pm$ 0,03 ^{ab}	3,31 $\pm$ 0,07	25,60 $\pm$ 0,57	0,22 $\pm$ 0,01 ^g	2,73 $\pm$ 0,06	20,65 $\pm$ 0,49	0,54 $\pm$ 0,02 ^j	2,65 $\pm$ 0,02	19,90 $\pm$ 0,14
<i>B. megatherium</i>	96	0,14 $\pm$ 0,02 ^{bc}	2,52 $\pm$ 0,05	18,80 $\pm$ 0,42	0,08 $\pm$ 0,02 ^a	2,39 $\pm$ 0,06	17,64 $\pm$ 0,48	0,28 $\pm$ 0,03 ^b	2,32 $\pm$ 0,02	17,05 $\pm$ 0,21
<i>P. putida</i>	48	0,48 $\pm$ 0,02 ^j	3,33 $\pm$ 0,11	25,85 $\pm$ 0,92	0,35 $\pm$ 0,03 ^l	4,23 $\pm$ 0,05	33,59 $\pm$ 0,41	1,02 $\pm$ 0,01 ^p	3,29 $\pm$ 0,02	25,45 $\pm$ 0,21
<i>P. putida</i>	72	0,12 $\pm$ 0,02 ^{ab}	2,10 $\pm$ 0,14	15,15 $\pm$ 1,20	0,30 $\pm$ 0,03 ^j	3,09 $\pm$ 0,05	23,70 $\pm$ 0,42	0,42 $\pm$ 0,01 ^g	2,85 $\pm$ 0,05	21,70 $\pm$ 0,42
<i>P. putida</i>	96	0,28 $\pm$ 0,01 ^f	0,44 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,92	0,18 $\pm$ 0,01 ^e	2,83 $\pm$ 0,07	21,53 $\pm$ 0,60	0,82 $\pm$ 0,02 ^o	2,89 $\pm$ 0,03	22,00 $\pm$ 0,28

BSF: Concentração de biossurfactante

TS_{red}: redução da tensão superficial

* Letras diferentes na mesma coluna mostram que elas se diferem significativamente entre os valores do mesmo parâmetro (P < 0,05).

O valor mais elevado de TS foi novamente atingido pela bactéria utilizada como referência (*P. putida*), com redução de $33,59 \pm 0,41$ unidades no meio BH, apresentando concentração de biossurfactante equivalente a $4,23 \pm 0,05$ mg/L. Contudo, estes valores de redução de TS foram consideravelmente reduzidos com o tempo de cultivo. Particularmente, o que aconteceu pode ser representado pelo meio BS, no qual a redução de TS diminuiu de $28,85 \pm 0,92$, após 48 h, para apenas $0,85 \pm 0,92$ unidades, após 96h de fermentação. Entretanto, os microrganismos-alvo não apresentaram este comportamento, considerando que os valores de redução de TS permaneceram constantes durante o intervalo de tempo estudado. Estes valores estão de acordo com os obtidos por Haghighat et al. (2008), que avaliaram a TS de *B. licheniformis* e *B. subtilis* utilizando óleo cru (2%) como fonte de carbono, em agitador rotativo, sob os mesmos parâmetros do presente estudo, encontrando reduções de TS de 30 mN/m e 29 mN/m, respectivamente, após 48 h de crescimento. Porém, o óleo cru utilizado é composto por várias fontes diferentes de carbono e, neste estudo, apenas tolueno foi utilizado.

Mnif et al. (2011) expuseram que, ao utilizar hidrocarbonetos derivados de petróleo, as cepas testadas, dentre elas *B. licheniformis* isolada a partir de campos de petróleo, não apresentaram capacidade de utilizar tolueno como fonte de carbono. Contudo, Nicholson e Fathepure (2004) mostraram que 0,004% de tolueno foram consumidos durante 7 dias de experimento em agitador rotativo, enquanto a mesma concentração de benzeno, etilbenzeno e xileno foi metabolizada em aproximadamente 15 dias. Este fato denota que o tolueno apresenta efeito tóxico aos microrganismos, com maior dificuldade para ser removido do meio ambiente.

3.3.2. Fermentação para produção de biossurfactante em biorreator

Com base nos estudos preliminares realizados em agitador rotativo, que mostraram que a produção de biossurfactante é principalmente dependente da presença de uma fonte de carbono (tolueno), uma vez que o estresse provocado pela sua presença estimula a acumulação do biossurfactante, a cepa de *B. subtilis* foi selecionada para aumentar a escala do processo em biorreator de bancada na presença de tolueno sob diferentes salinidades. Diversas pesquisas sobre biorremediação em meio aquoso, contendo hidrocarbonetos, têm mostrado valor de TS igual ou superior a 65 mN/m sendo reduzidas a valores inferiores a 35 mN/m,

dependendo da capacidade das bactérias em produzir o biossurfactante (HAGHIGHAT et al., 2008; NICHOLSON; FATHEPURE, 2004; WANG et al., 2007; XIA et al., 2011).

De acordo com a Figura 3.2, a respeito do crescimento de *B. subtilis* em meio BS, o ensaio iniciou com TS de 73,5 mN/m, que permaneceu constante até 12 h de crescimento. Em seguida, a TS reduziu-se simultaneamente com o crescimento microbiano, atingindo maior redução da TS de 22,6 unidades após 15 h, com produção máxima de biossurfactante de 3,02 mg/L. O crescimento celular continuou até 24 h, atingindo concentração celular máxima de 0,36 g/L, enquanto o volume de tolueno presente no meio foi reduzido drasticamente após 12 h de ensaio (de 45 mL para 7,43 mL). A TS permaneceu praticamente constante no intervalo de 18 a 24 h, possivelmente devido ao biossurfactante ter atingido a CMC; isto é, quando se inicia a formação de micelas e a tensão superficial do fluido não é alterada (DESAI; BANAT, 1997; SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2010). Pode-se dizer, portanto, que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* atingiu a CMC durante a fase de crescimento exponencial.

Figura 3.2. Determinação de tensão superficial (◆); concentração de tolueno (■); concentração celular (▲); concentração de biossurfactante (●) em meio BS usando *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor de biossurfactante durante o processo fermentativo em biorreator.

Recentemente, Vaz et al. (2012) relataram que, conforme aumenta a concentração celular, há maior produção de biossurfactante, observada pelo decréscimo da TS. Os autores chegaram a esta conclusão após observar diminuição significativa da TS logo após 4 h de cultivo, que continuou até 24 h, quando se obteve o menor valor de TS (30,1 mN/m). Da mesma maneira, a diminuição

significativa da TS, de 71,2 mN/m para 27 mN/m, utilizando *B. subtilis*, já havia sido observada por Xia et al. (2011), logo no início das amostragens, evidenciando a produção de biossurfactante na fase inicial de cultivo.

No presente estudo, pode-se observar que, a partir de 24 h de cultivo, houve declínio do crescimento (de 0,36 g/L para 0,16 g/L). Considerando que o hidrocarboneto foi consumido praticamente em 15 horas, a única fonte de carbono alternativa encontrada pelos microrganismos pode ter sido o próprio biossurfactante produzido, o que é confirmado pelo aumento da TS do meio considerado, que variou de 33,8 mN/m (12 h) para 61,3 mN/m (24 h). Segundo Garcia et al. (2006), a biodegradação dos compostos tensoativos ocorre quando os microrganismos os utilizam como fonte de carbono e energia. Assim, após 24 h de ensaio, pode ter ocorrido a falta da fonte de carbono, causando o declínio de crescimento da cepa.

Os ensaios em meio BH (Figura 3.3) apresentam similaridade de resultados quando comparados com o meio BS (Figura 3.2), quanto à produção e ao consumo de biossurfactante, mas com maior desenvolvimento da biomassa, atingindo 0,90 g/L e menor redução da TS (18,9 unidades), correspondente à concentração de biossurfactante de 2,62 mg/L. O meio BH (110 mOsmol/L de osmolaridade) apresentou melhores resultados do que o meio BS (11 mOsmol/L), provavelmente devido à sua salinidade ser superior. Segundo Wang et al. (2007), a força iônica ou a salinidade do meio pode afetar o processo de solubilidade dos hidrocarbonetos.

Figura 3.3. Determinação de tensão superficial (◆); concentração de tolueno (■); biomassa (▲); concentração de biossurfactante (●) em meio BH usando *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor de biossurfactante durante o processo fermentativo em biorreator.

Por fim, em meio AM (Figura 3.4), a TS variou de 73,1 mN/m (inicial) para 56,5 mN/m (após 15 h de crescimento), significando redução de TS de 16,6 unidades e concentração de biossurfactante de 2,37 mg/L, valores um pouco mais baixos que os obtidos em meio BH e especialmente em meio BS (Figuras 3.2 e 3.3). Provavelmente, a concentração salina de AM interferiu na interação biossurfactante-hidrocarboneto, retardando, assim, a possível formação de vesículas no início do processo. Consequentemente, enquanto o microrganismo *B. subtilis* se adaptou bem aos meios salinos estudados, o aumento da salinidade reduziu brandamente a produção de biossurfactantes.

Figura 3.4. Determinação de tensão superficial (◆); concentração de tolueno (■); biomassa (▲); concentração de biossurfactante (●) em meio AM usando *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor de biossurfactante durante o processo fermentativo em bioreator.

Em meio AM (Figura 3.4), observou-se que o volume de tolueno permaneceu praticamente constante (45 - 41,8 mL) durante 12 horas de crescimento. Porém, a redução da concentração de tolueno, de 45 mL para 0,2 mL, foi observada em 15 h de ensaio, período no qual os biossurfactantes foram produzidos. Este resultado confirma que o *B. subtilis* utilizou o tolueno com fonte primária de carbono para o seu desenvolvimento e para produção de biossurfactante.

Segundo Desai e Banat (1997) e Aparna, Srinikethan e Hedge (2011), o biossurfactante pode ser extracelular, liberado para o meio de cultura, ou pode ser aderido à célula do microrganismo. Para avaliar esta afirmação, Pinto, Martins e Costa (2009) estudaram *B. subtilis*, medindo a TS do meio, com ou sem células, e observaram que não houve diferença significativa dos valores de TS obtidos (58,7 e

56,7 mN/m, respectivamente), concluindo-se que a produção de biossurfactante ocorreu por via extracelular.

Na Figura 3.5 A, referente ao cultivo fermentativo utilizando *B. subtilis* em meio BS, a formação de espuma começou a ser observada a partir de 12 h de ensaio, ficando mais visível após 24 h, que perdurou até ao final do experimento (42 h). Chen, Baker e Darton (2006) também observaram a formação de espuma após 12 h de ensaio com *B. subtilis*. Em meio BH (Figura 3.5 B), assim como no meio BS, houve formação de espuma após 12 horas de ensaio, sendo que, às 24 h, a produção aumentou consideravelmente, preenchendo praticamente todo o tanque do biorreator.

Conforme Winterburn e Martin (2012), as condições de operação do fermentador, como a taxa de aeração e agitação, influenciam o processo de formação de espuma. Além disto, a espuma tende a se acumular na superfície do meio de crescimento; contudo, se houver taxa de agitação e aeração suficientes, a espuma irá se misturar novamente e retornará ao meio.

Finalmente, em meio AM (Figura 3.5 C), a produção de espuma foi inferior às obtidas nos meios BS e BH. Acredita-se que estes resultados sejam devidos à alta concentração salina de AM (1100 mOsmol/L de osmolaridade), uma vez que, segundo Hanna et al. (2005), a presença de sal na solução provoca a diminuição das forças de repulsão eletrostáticas e permite a aproximação da parte polar, favorecendo a micelização do biossurfactante no sentido vertical, como uma haste, altamente flexível e sem-fim, com agregados de micelas – descrita por Zhai et al. (2006) como vesículas.

Figura 3.5 Cultivo demonstrando a produção de biossurfactante em biorreator de bancada utilizando *Bacillus subtilis* em meio BS (A), meio BH (B) e meio AM (C), na presença de tolueno.

Quando se excede a concentração necessária para a CMC, inicia-se a formação de espuma, quando há o acúmulo de micelas que funcionam como um reservatório de surfactante (CHEN; BAKER; DARTON, 2006). Confirmando esta observação, os referidos autores demonstraram que, após 14 h de cultivo, a concentração do biossurfactante, produzido por *B. subtilis*, foi de 32,5 mg/L no meio e de 1,79 mg/L na espuma. No presente estudo, a CMC foi atingida após aproximadamente 18 h, enquanto a formação de espuma ficou claramente visível depois de exceder este valor (24 h).

A formação de espuma é importante para o processo de fermentação, especialmente para produção de biossurfactantes extracelulares. A espuma é gerada no fermentador devido à presença de compostos tensoativos no meio de cultura, expressados pelos microrganismos durante o processo fermentativo (JUNKER, 2007). Este fato pode explicar o comportamento observado nos cultivos realizados neste trabalho. Em todos os casos, o biossurfactante foi consumido após a depleção do tolueno (entre 12 e 15 h), atingindo menor quantidade de biossurfactante após 18 – 24 h (1,81 mg/L em meio BS após 24 h, 1,29 mg/L em meio BH após 24 h, e 1,69 mg/L em meio AM após 18 h). Contudo, foi observada a recuperação da concentração de biossurfactante, que pode ser atribuída à formação de espuma, particularmente considerando-se que a maior quantidade de biossurfactante (3,01 mg/L) foi produzida em meio BH após 39 h de cultivo, independentemente de a concentração de biossurfactante, às 24 h (1,29 mg/L), ter sido o valor mais baixo. Isto pode ser devido à maior formação de espuma observada no tanque do bioreator utilizando este meio de cultivo.

3.4. CONCLUSÃO

Dentre os microrganismos avaliados, *B. subtilis* mostrou ser o mais apropriado para a produção de biossurfactante nos meios estudados (BS, BH e AM). A presença de tolueno estimulou mais a produção de biossurfactante do que o crescimento dos microrganismos utilizados no processo fermentativo em agitador rotativo. Sob estas condições, a produção de biossurfactante por *B. subtilis* foi praticamente similar aos valores obtidos pela cela de *P. putida*, utilizada como referência.

O aumento da salinidade dos meios diminuiu levemente a produção de biossurfactante pela bactéria estudada. Durante o processo, a quebra das moléculas do hidrocarboneto, com provável formação de micelas (vesículas), promoveu a biodisponibilidade do hidrocarboneto para o consumo bacteriano, consumindo, assim, rapidamente o tolueno como fonte de carbono.

A partir dos resultados obtidos, o *B. subtilis* pode ser considerado como uma cepa promissora para a biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos; entretanto, estudos posteriores devem ser conduzidos para otimizar o processo fermentativo.

CONCLUSÕES

- As melhores condições de operação foram com 300 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração, onde os valores máximos de k_La foram encontrados.
- A adição de sal aumentou a osmolaridade, enquanto a TS diminuiu quando surfactina foi adicionada aos meios contendo tolueno.
- A presença de tolueno proporcionou maiores valores dos expoentes da equação que relaciona k_La com o número de potência (α) e a velocidade superficial (β) em todos os meios, se comparados com aqueles contendo glicose ou extrato de levedura.
- Dentre os microrganismos avaliados, *B. subtilis* mostrou ser o mais apropriado para a produção de biossurfactante nos meios estudados (BS, BH e AM), contribuindo para a utilização do tolueno como fonte de carbono.
- A presença de tolueno estimulou mais a produção de biossurfactante do que crescimento dos microrganismos.
- O aumento da salinidade dos meios diminuiu levemente a produção de biossurfactante pela bactéria estudada.
- Durante o processo, a quebra das moléculas do hidrocarboneto, com provável formação de micelas (vesículas), promoveu a biodisponibilidade do hidrocarboneto para o consumo bacteriano, consumindo assim rapidamente o tolueno como fonte de carbono.
- A partir dos resultados obtidos, o *B. subtilis* pode ser considerado como uma cepa promissora para a biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos, entretanto estudos posteriores devem ser conduzidos para otimizar o processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, p.289–303, 2008.

AL-BAHRY, S.N.; AL-WAHAIBI, Y.M.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; JOSHI, S.J.; AL-MAKHMARI, H.S.; AL-SULAIMANI, H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.81, p.141-146, 2012. [Special Issue: 3rd. International Symposium on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems].

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* spp. on biodegradation of crude oil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2, Singapore, 2011. **Environmental Impact Studies and Evaluation: Different Techniques and Approach**. Singapore: CBEES, IEEE, 2011. v.6, p.71-75.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.95, p.23-29, 2012.

ASIMIEA, O.A.; SAM-WOBO, S.O. The impact of hydrocarbon waste from brass oil terminal on the phytoplankton and periphyton communities of Lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v.2, n.5, p.729-733, 2011.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, n.4/12, p.178-182, 1995.

BACHU, S. CO₂ storage in geological media: role, means, status and barriers to deployment. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.34, p.254–273, 2008.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, n.2, p.427–444, 2010.

BIDWELL, J.P.; SPOTTE, S. **Artificial seawater**: formulas and methods. Boston: Jones & Bartlett, 1985. 349p.

CANDAU, S.J.; ODA, R. Linear viscoelasticity of salt-free wormlike micellar solutions. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.183/185, p.5-14, 2001.

CERQUEIRA, V.S.; HOLLENBACH, E.B.; MABONI F.; VAINSTEIN M.H.; CAMARGO F.A.; PERALBA, M.C.R.; BENTO F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, v.102, n.23, p.11003-11010, 2011.

CETESB. Diretoria de Controle e Licenciamento Ambiental. **Texto explicativo**: relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2012. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2012/texto-explicativo.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2013.

CAZARIN, G.; AUGUSTO, L.G.S.; MELO, R.A.M. Doenças hematológicas e situações de risco ambiental: a importância do registro para a vigilância epidemiológica. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, n.3, p.380-390, 2007.

CHEN, C.Y.; BAKER, S.C.; DARTON, R.C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, n.12, p.1923–1931, 2006.

COSTA, A.S.; ROMÃO, L.P.C.; ARAÚJO, B.R.; LUCAS, S.C.O.; MACIEL, S.T.A. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. **Bioresource Technology**, v.105, p.31–39, 2012.

COUTINHO, R.C.P.; GOMES, C.C. Técnicas para remediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 17, São Paulo, 2007. São Paulo: ABRH, 2007. p. 1-19 Disponível em: http://www.abrh.org.br/SGCv3/UserFiles/Sumarios/e8d4cbabe081d15db94e34b6f4ced288_c28f9077c5a2df48c3fbcca60de14314.pdf. Acesso em: 17 abr. 2013.

DAIFULLAH, A.A.M.; GIRGIS, B.S. Impact of surface characteristics of activated carbon on adsorption of BTEX. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n.214, n.1/3, p.181–193, 2003.

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

DI MARTINO, C.; LÓPEZ, N.I.; IUSTMAN, L.J.R. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.67, p.15-20, 2012.

EPA. **Water quality assessment and total maximum daily loads information**. Washington: Office of Water U.S., 2008. Disponível em: <http://www.epa.gov/waters/ir/>. Acesso em: 20 mar. 2013.

EPA. **Mid-atlantic risk assessment**: risk-based concentration, 2012. Disponível em: http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/rb-concentration_table/GenericTables/index.htm. Acesso em: 17 abr. 2013.

FARHADIAN, M.; VACHELARD, C.; DUCHEZ, D.; LARROCHE, C. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. **Bioresource Technology**, v.99, n.13, p.5296-5308, 2008.

FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; GAUDET, G.; LARROCHE, C. Biodegradation of toluene at high initial concentration in an organic–aqueous phase bioprocess with nitrate respiration. **Process Biochemistry**, v.45, n.11, p.1758-1762, 2010.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo: EPU, 1980. 196p.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; SMYTH, T.J.P.; BANA, I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, p.617–627, 2010. [Review].

GAFAROV, A.B.; PANOV, A.V.; FILONOV, A.E.; BORONIN, A.M. Change in the composition of a bacterial association degrading aromatic compounds during oil sludge detoxification in a continuous-flow microbial reactor. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v.42, n.2, p.160-166, 2006.

GALACTION, A.I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNE, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v.20, n.1, p.85–94, 2004.

GARCIA, M.T.; CAMPOS, E.; DALMAU, M.; ILLÁN, P.; SÁNCHEZ-LEAL, J. Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. **Biodegradation**, v.17, p.39–46, 2006.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. **Chemical Engineering Science**, v.59, n.12, p.2489–2501, 2004.

GIL, A.; ASSIS, F.; ALBENIZ, S.; KORILI, S. Removal of dyes from wastewaters by adsorption on pillared clays. **Chemical Engineering Journal**, n.168, p.1032–1040, 2011.

GRAY, P.H.H.; THORNTON, H.G. Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds. **Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 2, Naturwissenschaftliche: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie**, v.73, p.74-96, 1928.

HAGHIGHAT, S.; AKHAVAN, A.S.; MAZAHARI, A.M.; PASDAR, H. Ability of indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil recovery. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.5, n.3, p.385-390, 2008.

HANNA, K.; DENOYEL, R.; BEURROIDES, I.; DUBÈS, J.P. Solubilization of pentachlorophenol in micelles and confined surfactant phases. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.254, p.231-239, 2005.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J.N.; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, v.6, p.243-248, 1990.

JAMNONGWONG, M.; LOUBIERE, K.; DIETRICH, N.; GILLES HÉBRARD, G. Experimental study of oxygen diffusion coefficients in clean water containing salt, glucose or surfactant: Consequences on the liquid-side mass transfer coefficients. **Chemical Engineering Journal**, v.165, n.3, p.758-768, 2010.

JANBANDHU, A.; FULEKAR, M.H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.187, p.333-340, 2011.

JUNKER, B. Foam and its mitigation in fermentation systems. **Biotechnology Progress**, v.23, p.767-784, 2007.

KACZOREK, E.; URBANOWICZ, M.; OLSZANOWSKI, A. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v.81, n.1, p.363-368, 2010.

KASHID, M.N.; RENKEN, A.; KIWI-MINSKER, L. Gas-liquid and liquid-liquid mass transfer in microstructured reactors. **Chemical Engineering Journal**, v.66, n.17, p.3876-3897, 2011.

LEBRERO, R.; ESTRADA, J.M.; MUÑOZ, R.; QUIJANO, G. Toluene mass transfer characterization in a biotrickling filter. **Biochemical Engineering Journal**, v.60, p.44-49, 2012.

LIN, C.W.; WU, C.H.; TANG, C.T.; CHANG, S.H. Novel oxygen-releasing immobilized cell beads for bioremediation of BTEX-contaminated water. **Bioresource Technology**, v.124, p.45-51, 2012.

LOPES, A.G.; MARKER, A.; GLOEDEN, E.; CROZERA, E.H.; WEBER, J.; FRACCAROLI, M.J.B.; ALMEIDA, N.A.; CUNHA, R.C.A.; AQUINO NETO, V.; AQUINO, W.F. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: CETESB/GTZ, 2001. [Projeto de Cooperação técnica Brasil-Alemanha].

MACHADO, C.F. **Exercício prático de avaliação e gerenciamento de riscos: o caso dos trabalhadores expostos ao benzeno no Brasil**. Brasília: OPS, 2000. 350p.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v.1, n.5, p.1-19, 2011.

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.346-353, 2007.

MARQUES Jr., A.N.; MORAES, R.B.C.; MAURAT, M.C. Poluição marinha. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A., orgs. **Biologia marinha**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. p.505-528.

MARQUES, D.A.V.; TORRES, B.R.; PORTO, A.L.F.; PESSOA Jr., A.; CONVERTI, A. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.47, p.122–126, 2009.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13–18, 2011.

MINETA, R.; SALEHI, Z.; YOSHIKAWA, H.; KAWASE, Y. Oxygen transfer during aerobic biodegradation of pollutants in a dense activated sludge slurry bubble column: Actual volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen uptake rate in *p*-nitrophenol degradation by acclimated waste activated sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v.53, p.266-274, 2011.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.525–536, 2011.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.11, p.509–515, 2006.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v.94, p.736-747, 2008.

NICHOLSON, C.A.; FATHEPURE, B.Z. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.2, p.1222–1225, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v.97, p.336–341, 2006.

OESP. **O Estado de São Paulo**. Caderno de Notícias, São Paulo, SP. 2000 a 2013. Diário. ISSN: 1516-294-X.

OZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v.36, n.8/9, p.729–741, 2011.

PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactante bacterianos. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2104-2108, 2009.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, 2006. 61p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

PIRÔLLO, M.P.S.; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.5, p.1484–1490, 2008.

PRIEBE, J.P.; SOUZA, F.D.; SILVA, M.; TONDO, D.W.; PRIEBE, J.M.; MICKE, G.A.; COSTA, A.C.; BUNTON, C.A.; QUINA, F.H.; FIEDLER, H.D.; NOME, F. The chameleon-like nature of zwitterionic micelles: effect of cation binding. **Langmuir**, v.28, n.3, p.1758-1764, 2012.

PUEYO, M.T.; BLOCH Jr., C.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; DI MASCIO, P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. **Microbial Ecology**, v.57, n.2, p.367-378, 2009.

PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.25–30, 2005.

RICHARDS, J.W. Studies in aeration and agitation. **Progress in Industrial Microbiology**, v.3, p.143–172, 1961.

RODRÍGUEZ-PAZO, N.; SALGADO, J.M.; CORTÉS-DIÉGUEZ, S.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of phenyllactic acid and biosurfactants from trimming vine shoot hydrolyzates by microbial coculture fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.2175–2188, 2013.

ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena**. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2004. 444p.

SABRINA, N.; MUTAMIM, A.; NOOR, Z.Z.; HASSAN, M.A.A.; OLSSON, G. Application of membrane bioreactor technology in treating high strength industrial wastewater: a performance review. **Desalination**, v.305, p.1-11, 2012.

SETTE, L.D.; SIMIONI, K.C.; VASCONCELLOS, S.P.; DUSSAN, L.J.; NETO, E.V.; OLIVEIRA, V.M. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.91, n.3, p.253-266, 2007.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v.3, p.123–133, 2008.

SHIM, H.; MA, W.; LIN, A.; CHAN, K. Bio-removal of mixture of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes/total petroleum hydrocarbons/trichloroethylene from contaminated water. **Journal of Environmental Sciences**, v.21, p.758–763, 2009.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a general overview. In: SOBERON-CHAVEZ, G., ed. **Biosurfactants: from genes to applications**. New York: Springer, 2010. p.1-11. (Microbiology monographs, v.20).

SUWANSUKHO, P.; RUKACHISIRIKUL, V.; KAWAI, F.; H-KITTIKUN, A. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.30, suppl.1, p.87-93, 2008.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of Biosurfactants producing bacteria from oil reservoirs. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v.2, p.6-12, 2005.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. Biosurfactants from marine bacterial isolates. In: MÉNDEZ-VILAS, A., ed. **Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. v.2, p.1367-1373. (Microbiology book series, n.2).

THOMÉ, C. Mancha de óleo teve redução de 12 Km² para 2 Km². **O Estado de São Paulo**, 22 nov. 2011. Caderno de Notícias. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,mancha-de-oleo-teve-reducao-de-12-km2-para-2-km2,801679,0.htm>. Acesso em: 20 jan. 2013.

TONDO, D.W.; LEOPOLDINO, E.C.; SOUZA, B.S.; MICKE, G.A.; COSTA, A.C.O.; FIEDLER, H.D.; BUNTON, C.A.; NOME, F. Synthesis of a new zwitterionic surfactant containing an imidazolium ring: evaluating the chameleon-like behavior of *Zwitterionic micelles*. **Langmuir**, v.26, n.20, p.15754–15760, 2010.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v.57, p.1139–1150, 2004.

VAN DER VEGT, W.; VAN DER MEI, H.C.; NOORDMANS, J.; BUSSCHER, H.J. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.766–770, 1991.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.503-549, 2003.

VAZ, D.A. ; GUDIÑA, E.J.; ALAMEDA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.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, p.167–174, 2012.

WANG, Q. ; FANG, X.; BAI, B.; LIANG, X.; SHULER, P.J.; GODDARD III, W.A.; TANG, Y. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. **Biotechnology and Bioengineering**, v.98, n.4, p.842–853, 2007.

WELTLER-TONINI, R.M.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v.4, n.14, p.1010-1020, 2010.

WINTERBURN, J.B.; MARTIN, P.J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnology Letters**, v.34, p.187–195, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality: incorporating first addendum**. 3.ed. Geneva: WHO, 2006. 595p. [v.1: Recommendations].

XIA, W.J.; DONG, H.P.; YU, L.; YU, D.F. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.392, p.124–130, 2011.

YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1706–1713, 1995.

YEUNG, C.W.; LAW, B.A.; MILLIGAN, T.G.; LEE, K.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and sediments from an offshore oil and gas production platform. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, n.10, p.2095-2105, 2011.

YOSHIDA, F.; IKEDA, A.; IMAKAWA, S.; MIURA, Y. Oxygen absorption rates in stirred gas–liquid contactors. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.58, p.32–40, 1960.

ZENG, G.; FU, H.; ZHONG, H.; YUAN, X.; FU, M.; WANG, W.; HUANG, G. Codegradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. **Biodegradation**, v.18, n.3, p.303–310, 2007.

ZHAI, L.; TAN, X.; LI, T.; CHEN, Y.; HUANG, X. Influence of salt and polymer on the critical vesicle concentration in aqueous mixture of zwitterionic/anionic surfactants. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.276, p.28-33, 2006.

ZHANG, L.; ZHANG, C.; CHENG, Z.; YAO, Y.; CHEN, J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. **Chemosphere**, v.90, p.1340-1347, 2013.

ZOBELL, C.E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v.10, p.1-49, 1946.

ANEXO – Artigos Científicos

Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview – Submetido à revista International Biodeterioration & Biodegradation	76
Experimental study of mass transfer coefficient in aerobic fermentation systems: effect of composition of culture media and salinity – Submetido à revista Aquacultural Engineering	110
Influence of toluene and salinity on biosurfactants production by different <i>Bacillus</i> strains: scale up from shaker to bench bioreactor – Submetido à revista Bioresource Technology	132

ARTIGO 1

Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview – Submetido à revista **International Biodeterioration & Biodegradation**

Elsevier Editorial System(tm) for
International Biodeterioration & Biodegradation
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: BIOSURFACTANT-ENHANCED HYDROCARBON BIOREMEDIATION: AN OVERVIEW

Article Type: Review Article

Keywords: Biosurfactant; Bioremediation; BTEX hydrocarbons; Biodegradation

Corresponding Author: Dr Ricardo Pinheiro de Souza

Oliveira, Ph.D Corresponding Author's Institution:

University of São Paulo

First Author: Ellen C Souza, Master's student

Order of Authors: Ellen C Souza, Master's student; Thereza Christina

Vessoni-Penna, Ph.D; Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Ph.D

Abstract: Contamination of water and soil by aromatic hydrocarbons has been increasing along the years, due to its use in various industrial segments. Hydrocarbons are described as extremely polluting, toxic, potentially carcinogenic and mutagenic to humans. The concern with these compounds increases due to difficulties in removing them from the environment. The methods for remediation of contaminated environments are based on chemical, physical or biological activity. With the advancement of sustainable technologies, there has been an increase in the search for natural methods for the removal and/or degradation of contaminants from soil and water. Biosurfactants are surfactants produced mainly by microorganisms, which promote the breaking of hydrocarbons molecules, by means of the formation of micelles, increasing their mobility, bioavailability and exposure to bacteria favoring hydrocarbon biodegradation. There is a great diversity of microorganisms that are capable of biodegrading pollutants as oil and produce biosurfactants, but they are little known. This study aims at addressing issues related to a series of parameters involved in the production, mobilization mechanism and the action of biosurfactant monomers in places containing hydrocarbons.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo, June 13th, 2013

Dear **Prof. Dr. Passman, Editor**

As a response to the invitation sent by you, we are submitting this manuscript entitled "Biosurfactant-Enhanced Hydrocarbon Bioremediation: An Overview" by Souza, Vessoni-Penna, and Oliveira, for consideration of publication in International Biodeterioration & Biodegradation. The manuscript describes a series of parameters involved in the production, mobilization mechanism and the action of biosurfactant monomers in places containing hydrocarbons. Please contact me if you have any questions. I'd like to have your personal opinion about this manuscript. I appreciate any suggestion for the improvement of our article. For me, it would be an honor publishes the present review in this renowned journal.

Looking forward to hearing from you, I remain

Yours sincerely

Ricardo

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

University of São Paulo

Highlights

- Hydrocarbons are extremely polluting, toxic, potentially carcinogenic and mutagenic to humans
- The methods for remediation of contaminated environments are based on chemical, physical or biological activity
- Biosurfactants promote the breaking of hydrocarbons molecules
- A great diversity of microorganisms are capable of biodegrading pollutants as oil and produce biosurfactants

BIOSURFACTANT-ENHANCED HYDROCARBON BIOREMEDIATION: AN OVERVIEW

Ellen Cristina Souza^a, Thereza Christina Vessoni-Penna^a, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira^{a*}

^aBiochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil

*Corresponding Author: Ricardo Pinheiro.

Telephone: +55(11) 3091-0123.

E-mail: rpsolive@usp.br

ABSTRACT

Contamination of water and soil by aromatic hydrocarbons has been increasing along the years, due to its use in various industrial segments. Hydrocarbons are described as extremely polluting, toxic, potentially carcinogenic and mutagenic to humans. The concern with these compounds increases due to difficulties in removing them from the environment. The methods for remediation of contaminated environments are based on chemical, physical or biological activity. With the advancement of sustainable technologies, there has been an increase in the search for natural methods for the removal and/or degradation of contaminants from soil and water. Biosurfactants are surfactants produced mainly by microorganisms, which promote the breaking of hydrocarbons molecules, by means of the formation of micelles, increasing their mobility, bioavailability and exposure to bacteria favoring hydrocarbon biodegradation. There is a great diversity of microorganisms that are capable of biodegrading pollutants as oil and produce biosurfactants, but they are little known. This study aims at addressing issues related to a series of parameters involved in the production, mobilization mechanism and the action of biosurfactant monomers in places containing hydrocarbons.

Keywords: Biosurfactant; Bioremediation; BTEX hydrocarbons; Biodegradation

1. HYDROCARBON CONTAMINATION

Concerns related to the potential for contamination of soil and water by petroleum and its derivatives are increasing, as they are one of the main contaminants in the environment. The sources of contamination are diverse, such as accidents in the transportation of fuels by ships and trucks, leaks from underground storage tanks, which are subject to corrosion, as in gas stations, petroleum extraction and processing operations and inadequate release of oily wastes generated by industries that use petroleum derivatives in the production of plastics, solvents, pharmaceuticals and cosmetics (EPA - Environmental Protection Agency of United States, 2008; Lin et al., 2010).

Although petrochemical plants and oil refineries are beneficial to society, they produce great quantity of solid oily waste (about 10,000 m³ per day) classified as hazardous waste, which cannot be either reused or recycled and are flammable, corrosive, toxic or pathogenic (Gafarov et al., 2006).

In refineries, petroleum is converted into gasoline and diesel fuel. Gasoline consists of relatively volatile hydrophobic hydrocarbons such as alkanes, cycloalkanes, BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene), phenol and polycyclic aromatic hydrocarbons. Many of these compounds are described as highly polluting, for, in addition to being toxic, they present a carcinogenic and mutagenic potential to humans (Janbandhu and Fulekar, 2011). BTEX hydrocarbons have become a major concern in water pollution due to their toxicity and capacity of easily moving in the environment (Mazzeo et al., 2011).

According to the environmental control agency of the State of São Paulo, Brazil, the Company of Technology in Environmental Sanitation (CETESB),

leaks in gas stations were accounted for 78% of cases of contaminated areas in the State of São Paulo in 2011, which corresponds to 3,217 areas.

About 90% of the gasoline hydrocarbons spilled into the environment, found in drinking water sources, are composed of BTEX, which raises concerns on environmental health because of their toxic, mutagenic and carcinogenic properties (Janbandhu and Fulekar, 2011).

When leakages in fuel tanks occur, hydrocarbons are dispersed and penetrate the soil. According to Bachu (2008), the migration of these compounds is regulated by the formation of four distinct phases, known as: Residual liquid phase - liquid waste are relatively immobile, adsorbed or retained in the solids of soil; Free liquid phase - without the presence of waste, they easily migrate through the soil, with the possibility of reaching ground water; Dissolved phase - in this phase hydrocarbons form a layer on the solid surface or soil water and when they reach the underground water they form a contamination plume; and Vapor phase – they join the soil vapor and may condense and adsorb on the solid surface or dissolve in the soil water.

The high soil-water mobility of these hydrocarbons is related to their low octanol-water partition coefficient, which ensures a slow absorption by the soil and allows transportation by water, quickly moving through the soil, favoring groundwater contamination (Farhadian et al., 2008).

1.1. Risks posed by hydrocarbons

Soil and groundwater contamination by hydrocarbons present in fuels has become a focus of great concern both in the industrialized and developing countries, due to its broad environmental distribution, which can reach the soil, groundwater and air (Lebrero et al., 2012). BTEX hydrocarbons are present in the composition of gasoline and diesel fuel, they are the first to reach ground water, as their constituents are highly soluble in water (Mariano et al., 2007). Consequently, these highly toxic compounds (except ethylbenzene) are the major causes of death by toxicity (Janbandhu and Fulekar, 2011).

Fellenberg (1980) reported that petroleum and its derivatives spread in contact with water, forming a thin layer on the surface which prevents gases exchange between the air and water and blocks sunlight to phytoplankton, breaking the food chain. Confirming this theory, Asimiea and Sam-Wobo (2011) observed the impact of hydrocarbon waste on phytoplankton communities, which suffered structural changes due to the presence of these compounds.

One liter of oil can deplete the oxygen in one million liters of water and form a thin layer on the surface of 1000 m² of soil in a few days, blocking the passage of sunlight and water, which prevents the respiration and photosynthesis of plants (Yeung et al., 2011). Plants are prevented from performing respiration and photosynthesis, due to sealing the entrance of stomata, while roots of plants are inhibited from the absorption of soil nutrients (Fellenberg, 1980).

The marine environment has suffered with constant oil spills, making petroleum one of the most abundant organic contaminants in the sea. Media has

116 been constantly denouncing the leak of thousands of tons of petroleum that
117 contaminate seawater (OESP 2000 to 2013).

118 Half of world oil production (around three billion tonnes/year) is
119 transported by ships through the oceans, increasing the levels of hydrocarbon
120 contamination in various marine ecosystems due to possible accidents. However, the
121 major source of hydrocarbons in the marine environment comes from routine
122 operations of ship washing, natural oil leaks on the ocean floor and mainly by
123 accidents in the exploration and transportation of oil (Marques Jr. et al., 2009).

124 One of the most impacting spills occurred recently in November 2011 in
125 the Sedco 706 petroleum platform, operated by Chevron Brasil in the Campos Bay
126 (Rio de Janeiro, Brazil), which was equivalent to 594,3 liters, reaching about 163 Km²
127 (ANP, 2011).

128 The potential threat to human health posed by hydrocarbons is
129 connected to its physical and chemical properties, which allow these compounds to
130 be absorbed by the skin and quickly spread through the whole body, if ingested or
131 inhaled (Costa et al., 2012).

132 Exposure to BTEX hydrocarbons for a long time at low concentrations
133 presents a series of chronic effects. Among them, benzene is regarded to be the
134 most toxic and with the potential to cause depression of pluripotent primitive blood
135 cells, extending through any stage of cell maturation; damage to the bone marrow,
136 such as necrosis, edema, hemorrhage and fibrosis which also interfere with the
137 production of blood cells, leukemia and liver cancer. The estimated value of the lethal
138 minimum dose (LDL) for humans is 194 mg.Kg⁻¹ (Melo et al., 2007).

139 In 2000, Machado described the embryotoxicity of hydrocarbons,
140 reporting that women who had had been exposed to high levels of benzene in their

141 professions had menstrual abnormalities, decrease in the size of ovaries and
142 potential fertility reduction.

143 Toluene presents moderate systemic toxicity to human beings. If
144 ingested, toluene is completely absorbed by the gastrointestinal tract system and is
145 rapidly distributed to the body, mainly on the adipose tissues, metabolized and
146 excreted in the urine. When inhaled, this hydrocarbon compromises the central
147 nervous system and may cause excitement or depression, with euphoria in the
148 induction stage and further disorientation, shiver, dismay, hallucinations, convulsions
149 and coma. It may cause electrolyte abnormalities, metabolic acidosis, arrhythmias,
150 muscle weakness, irritation in the mucosa membranes, transitional anomalies on the
151 liver enzyme activities and kidney problems. Moreover, embryotoxic and fetotoxic
152 effects have been observed, though there are no clear evidences of teratogenic or
153 carcinogenic activity in humans or laboratory animals (World Health Organization
154 2006; Asimieae and Sam-Wobo, 2011).

155 Ethylbenzene and xylene, which have low systemic toxicity, are usually
156 stored on adipose tissues and are almost completely metabolized and excreted in the
157 urine. Both of them are depressors of the central nervous system; where the first is a
158 sensorineural irritant, and the latter, a skin and mucosa membranes irritant. Studies
159 carried out with both hydrocarbons have shown negative evidences for teratogenicity,
160 carcinogenicity, metagenesis or genotoxicity (World Health Organization, 2006).

161 According to the EPA (2012), the specific chemical concentration to
162 reach the risk level of a contaminant is called Risk-based concentration (RBC).
163 According to the agency, in underground water, benzene RBC is 2×10^{-4} (mg/kg),
164 toluene RBC is 5.9×10^{-1} , ethylbenzene RBC is 1.5×10^{-3} (mg/kg), and xylene RBC is
165 1.9×10^{-1} . In 2001, the same organization determined that the maximum BTEX

166 components level in potable water is of 0.005 mg.L⁻¹ benzene, 1.0 mg.L⁻¹ toluene, 0.7
167 mg.L⁻¹ ethylbenzene and 10 mg⁻¹ xylene.

168 In 2006, World Health Organization (WHO) determined that the
169 maximum concentrations allowed from BTE components in potable water were:
170 0.01 mg.L⁻¹ benzene, 0.7 mg.L⁻¹ toluene, 0.3 mg.L⁻¹ ethylbenzene and 0.5 mg.L⁻¹
171 xylene. In Brazil, the maximum concentration of these hydrocarbons, established by
172 Brazil's National Council of the Environment for effluents discharge in water is
173 1.2 mg.L⁻¹ benzene and toluene, 0.84 mg.L⁻¹ ethylbenzene and 1.6 mg.L⁻¹ xylene
174 (Conama, 2011).

175 In light of the problems caused by hydrocarbons, both for the
176 environment and human beings, the search for methods that contribute to removing
177 or reducing these compounds in the environment has been increasing.

2. REMEDIATION OF THE BTEX COMPOUNDS

Compounds from the BTEX group, present in gasoline and diesel, present higher solubility in water than the other components of these fuels, which explains the fact that they are the contaminants found in larger amounts on groundwater, led by underground water, when underground tanks leak (Mariano et al., 2007). As approached, these hydrocarbons are dangerous to human health, creating a need to study methods that contribute to removing or reducing such compounds in the environment.

Remediation methods to contaminate environments are based on chemical, physical or biological means. Table 1 summarizes the main remediation techniques, as well as the possible compounds removed (Coutinho and Gomes, 2007).

Currently, the most used method is Pump and Treat, in which the contaminated soils or waters are removed by extraction wells that pump them to the surface, so that they can be treated through filter systems, volatile compounds extraction in venting tower or activated carbon, so they can be further rearranged. However, power and materials consumption for water and gas treatment are high, besides the expenses involved in the pumping system operation and maintenance and chemical analyses performance (CETESB/GTZ, 2001).

Remediation by chemical method is done by adding chemical compounds to deteriorate contaminants, i.e., to turn them into less toxic substances to the environment. The chemical reactions used include oxidation, reduction, polymerization or precipitation; oxidation is the most used method. The oxidants used are: ozone, peroxides, permanganate and persulphates. Even though it is a safe

method with quick action, oxidant compounds are corrosive and can cause explosions, if used in improper conditions, and, at the end of the process, harmful substances to the local biota can still remain (CETESB/GTZ, 2001).

Chemical remediation is also applied on the soil washing technique, which uses surfactants that reduce the interfacial tension of oil/water, in a way that the oil stays in solution, thus promoting the removal of the contaminant. This technique is applied *in situ*, though it is not quite used, once the surfactant may turn to be another contaminant on the environment; or in reactors (CETESB).

The removal of these hydrocarbons can also be carried out by physical and chemical methods, such as the adsorption process. Activated carbon, used in this process, enables the recovery of the adsorbent and adsorbed, though it is a technique that requires many expenses (Daifullah and Girgis, 2003). Montmorillonite (a type of clay) has also been quite used for this purpose, once it has a low cost, does not present toxicity to the environment and is highly adsorbent; however, this clay has a hydrophilic nature, which renders it not effective in removing non-polar organic pollutants, which is the case of BTEX hydrocarbons (Gil et al., 2011).

With the advance of sustainable technology, the search for natural methods for the removal and/or degradation of soil and water contaminants has increased. The removal of these pollutants can be reached through biological treatment, which can provide advantages in comparison with physical and chemical treatments. These advantages include low operation cost, low energy consumption and the absence of residual products (Shim et al., 2009).

The phytoremediation process is carried out with plants that are capable of degrading, extracting, containing or immobilizing soil and water contaminants (CETESB/GTZ, 2001). There several types of phytoremediation:

- a. Phytoextraction and phytovolatilization: processes that use plants called hyperaccumulator plants, which absorb, remove and dislocate the soil contaminants to their roots and upper parts.
- b. Phytostabilization: uses plants that immobilize soil contaminants through sorption and precipitation in the rhizosphere.
- c. Phytodegradation: promotes the degradation of organic contaminants by stimulating the microbial activity in the rhizosphere.
- d. Rhizofiltration: process which uses sorption or precipitation of contaminants that are in solution around the roots, due to biotic or abiotic processes.

Besides phytoremediation, there is another process based in the use of living organisms to remediate sites contaminated by hydrocarbons, called Bioremediation. This technique consists in the biological decomposition of hydrocarbons by microorganisms that use the pollutants as a carbon source to obtain power, biodegradating them into carbon dioxide, water, mineral salts and gases (Banat et al., 2010).

The largest the degrading microorganisms population is, the quicker and more efficient the bioremediation process will be. Therefore, this technique can be carried out by biostimulation, which consists in the growth stimulation of the microorganisms present at the contaminated site. This process can be carried out by

introducing oxygen, nutrients, electron receptors specific to the degradation of the contaminant and substances to correct the pH. It can also be made by bioaugmentation, in which indigenous microorganisms (allochthonous) are added to the contaminated environment to accelerate and complete the pollutant degradation (CETESB/GTZ, 2001).

Low solubility and high hydrophobicity of hydrocarbons make them highly unavailable to microorganisms. Microorganisms produce biosurfactants in order to degrade hydrocarbons and use them as carbon source (Desai and Banat, 1997).

Biosurfactants are surfactants synthesized as metabolic products of different microorganisms, mainly aerobic ones, such as bacteria, yeasts and filamentous fungi using several substrates such as carbohydrates, hydrocarbons, oils and fats, industrial and agricultural residues or a mix of them (Pirôllo et al., 2008).

A property of great importance to industrial and biotechnological applications is the stability of most biosurfactants in different conditions, enduring the high temperatures of autoclaving (121°C for 20 min) and also low temperatures (-18°C for 6 months), and pH (5-11) found in the environment (Muthusamy et al., 2008).

The main biosurfactants classes known at the moment, according to Pirôllo (2006), are glycolipids (rhamnolipids, sophorolipids, trehalose lipids), lipopeptide and lipoproteins (peptide, viscosine, serrawettin, surfactin, subtilisin, gramicidin, polymyxin), fatty acids, neutral lipids and phospholipids, polymeric surfactants (emulsan, biodispersan, liposan, carbohydrate-lipid-protein, manana-lipid-protein) and particle surfactants.

277 Biosurfactants present many advantages in comparison with synthetic
278 surfactants, such as high biodegradability, low toxicity, biocompatibility,
279 biodigestibility (which enables their use in cosmetic and pharmaceutical products and
280 as food additives), possibility to be produced from low-cost sources and industrial
281 waste, use in bioremediating sites affected by oil, biodegradation and detoxification
282 of industrial effluents, besides efficacy in extreme temperature, pH and salinity
283 conditions (Pirôllo, 2006).

284

285

3. BIOSURFACTANT

With the advance of sustainable technologies, the search for natural, biodegradable compounds to remediate sites contaminated by hydrocarbons has been increasing. This search has led to the discovery that many surfactants can have natural origin, being part of several cellular structures and biological membranes. Most of these surfactant agents are synthesized by living organisms, such as: saponins, produced by plants; glycolipids, by microorganisms; and bile salts, from animals. These compounds with surfactant properties produced by microorganisms are called biosurfactants (Aparna et al., 2011).

Biosurfactants have countless advantages in comparison to chemical surfactants, especially regarding biodegradability, compatibility to the environment, low toxicity, high selectivity and their activity even in extreme temperatures, pH and salinity conditions (Banat et al., 2010). These compounds are surfactant agents and have amphipathic molecules (Figure 1), with hydrophobic and hydrophilic portions that act between fluids of different polarities (oil/water and water/oil), allowing access to hydrophobic substrates and causing changes, such as reduction of the surface tension and increasing the area of contact of the insoluble compounds (such as hydrocarbons), its mobility, bioavailability and, further, its biodegradation (Aparna et al., 2011).

Biosurfactants have lipophilic groups of proteins and/or peptides with hydrophobic parts or carbonated chains of 10 to 18 carbons, and hydrophilic groups characterized by esters, hydroxyl, phosphate, carboxyl or carbohydrates. They are usually produced in the exponential phase or stationary phase of microbial growth, when there is a high cellular density (Suwansukho et al., 2008).

Biodegradation of hydrocarbons derived from petrol by biosurfactants occurs by means of two mechanisms. The first one includes the increase of the biological availability of the hydrophobic substrate to microorganisms, with consequent reduction of the surface tension of the medium around the bacterium and the reduction of the interfacial tension between the bacterial cell wall and the hydrocarbon molecules. The other mechanism involves the interaction of the biosurfactants with the cell surface, promoting modifications in the membrane, facilitating hydrocarbon adherence (hydrophobicity increase) and reducing the lipopolysaccharide index of the cell wall without damaging the membrane (Aparna et al., 2011).

Thus, biosurfactants block the development of hydrogen bridges and allow hydrophobic-hydrophilic interactions, which cause molecular rearrangement and reduce surface tension of the liquid, increasing its superficial area and promoting bioavailability and consequent biodegradability (Aparna et al., 2011).

Consequently, the production of biosurfactants is indirectly evaluated by the surface tension, which is related to the forces of attraction and repulsion between the molecules of a fluid. In order to keep the molecules cohesive on the liquid surface, they exert a strong intermolecular force of attraction on the molecules that are closer to the surface, called surface tension. Hence, the liquids tend to decrease their surface area, creating spherical drops that present lower surface/volume ration (Piróllo et al., 2008).

Physically speaking, the surface tension would be the necessary energy to dilate the surface of a liquid. The higher the cohesion between the molecules of the liquid is, the higher the work required to increase the distance between them will

be, i.e., the highest the force of attraction between the molecules is, the higher the surface tension will be (Pirôllo et al., 2008).

3.1. Action mechanism and biosurfactants efficiency

When biosurfactants are released, their monomers organize spherically (micelles), in a way that the hydrophobic portion is turned to the center, composing the nucleus, and the hydrophilic part is turned to the surface of the sphere, making an interface with the water. Thus, the surfactant agent reduces the surface tension between water and oil and contributes to the formation of micelles, increasing hydrocarbon exposure to bacteria and oxygen and favoring biodegradation of the hydrocarbon (Soberón-Chavez and Maier, 2010).

The modifications in the membrane, such as change in proteins composition or the increase of hydrophobicity of the cell wall by the reduction of lipopolysaccharides, caused by the biosurfactants, promote higher accessibility to hydrocarbons by microbial cells. This occurs due to the dispersion of the hydrocarbon through its encapsulation in micelles, spherical or irregular vesicles and lamellar structures (Aparna et al., 2012).

The representation of micelles formation follows Stigter's scheme, on which surfactant monomers organize spherically with the hydrophobic part composing the nucleus, and the hydrophilic portion on the external part of the grouping, making an interface with the water. In a micelle, on the hydrophilic end of the biosurfactant, which makes an interface with the water, a double, compact, electric layer that surrounds the external surface of the micelle sphere is formed and is called Stern Layer (Tondo et al., 2010).

The biosurfactant efficiency is determined through the critical micelle concentration (CMC), point in which micelles start to develop (Soberón-Chavez and Maier, 2010). These aggregates are produced as a result of several weak chemical interactions, such as Van der Waals and hydrogen bridges. The formation of mycelles leads to reduction in the surface and interfacial tension, due to the decrease in the force of repulsion between the phases of the immiscible fluids (Aparna et al., 2012).

The molecule mobilization mechanism, which provokes the reduction of surface tension between air/water and soil/water, occurs in biosurfactant concentrations below CMC. The solubilization process starts in concentrations above CMC due to the formation of micelle that increase oil solubility (Urum and Pekdemir, 2004). The emulsification process starts when there is accumulation of biosurfactant, creating a solution containing tiny droplets of oil suspended in aqueous medium. The high molecular weight of the biosurfactants makes them efficient emulsifying agents, being also used as additive to simulate the bioremediation and removal of hydrocarbons from the environment (Franzetti et al., 2010).

An efficient biosurfactant has low CMC, in other words, a lesser quantity of surfactant is necessary to diminish the surface tension, showing a greater effectiveness and efficiency than chemical surfactants (Desai and Banat 1997; Aparna et al., 2012). Surfactin is one of the most efficient biosurfactants known, reducing water surface tension from 72 mN/m to 27 mN/m, which is close to the minimum detectable value (Seydlová and Svobodová, 2008).

The formation and accumulation of biosurfactant is related to a series of parameters that, according to Mukherjee et al. (2006), need to be more studied and comprehended so there is more efficiency when producing these compounds with

385 lower costs. The promising future of biosurfactants depends on the use of low cost
386 raw-material and the optimization of the growth conditions in order to obtain the
387 product.

388

389

390

4. BIOSURFACTANT PRODUCING MICROORGANISMS

The studies on the use of hydrocarbons by microorganisms have begun around 1906, performed by Sohnger and Kaserer. After a few years, in 1913, Sohnger proved that some microorganisms, mainly from the genera *Mycobacterium* and *Pseudomonas*, were capable of oxidizing gasoline, kerosene, paraffin and paraffin oil, CO₂, water and traces of organic acids (Zobell, 1946).

Thereafter, several studies have been performed in search of species capable of breaking aromatic compounds. In 1928, microorganisms from the genera *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Bacterium*, *Bacillus* and *Spirillum*, capable of breaking naphthalene, toluene, cresol and phenol were isolated by Gray and Thornton.

In 40 years, over 100 species from 30 microbial genera existing in the nature were described for their capacity of using hydrocarbons as their sole source of carbon and energy (Zobell, 1946).

Since the 90s, several microorganism genera were identified as hydrocarbon degraders: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio* sp. *Xanthomonas maltophilia*, among others (Mariano et al., 2007).

According to Weltler-Tonini et al. (2010), the main genera of bacteria capable of breaking petroleum derivatives are: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*,

Paracoccus, Pasteurella, Polaromonas, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Sphingomonas, Stenotrophomonas and Streptomyces Vibrio.

In addition to bacteria, actinomycetes and fungi are also producers of biosurfactants. However, when the biodegradation of aromatic hydrocarbon by fungi occurs, trans-diols, potent carcinogens, are formed, while the biodegradation by bacteria produces cis-diols, which are not biologically active and produce no carcinogen (Atlas, 1995).

Since then nine bacteria groups have been found in oil samples from petroleum reservoirs such as: *Acinetobacter, Arcobacter, Bacillus, Halanaerobium, Leuconostoc, Marinobacter, Streptomyces, Propionibacterium* and *Streptococcus* (Sette et al., 2007).

It was revealed specifically in 1908 microorganisms' ability to degrade hydrocarbons derived from BTEX petroleum, when the bacteria *Bacillus hexabovorum*, isolated by Stormer, had shown itself capable of growing aerobically in a medium containing toluene and xylene (Zobell, 1946). In 1928, Gray and Thornton found among 245 bacteria species isolated from non-contaminated soils, 146 which had the ability to degrade BTEX hydrocarbons.

Biosurfactants are metabolites with surface activity produced by microorganisms in aqueous solutions containing hydrophobic compounds (Mukherjee et al., 2006). These surfactants comprise different structures and chemical compositions that vary depending on the producing microorganism, the nutrients from the culture medium and the growth conditions (Table 2). Consisting mainly on fatty acids, glycolipids, lipopeptides, lipopolysaccharides and lipoproteins (Makkar et al., 2011).

441 *Pseudomonas* is known for its ability to produce extensive quantities of
442 glycolipids. These biosurfactants produced are classified as Rhamnolipids, capable
443 of reducing water surface tension to values between 25-30 mN/m, with CMC (critical
444 micelle concentration) between 10 to 230 mg/L, depending on the different microbial
445 sources, pH condition and salinity of the medium (Aparna et al., 2011).

446 Another microorganism broadly studied on its capacity of producing
447 biosurfactants is the *Bacillus subtilis*, known for its confirmed efficiency in producing
448 a lipopeptide with surface activity, named surfactin or subtilisin, one of the most
449 potent biosurfactants known, reducing water surface tension from 72 to 27 mN/m,
450 with CMC in 24 mM water (Desai and Banat, 1997; Al-Bahry et al., 2012).

451 Due to the great results obtained with surfactin, it has been studied the
452 biosurfactant production by other species of *Bacillus*. Yakimov et al. (1995) published
453 a work on the production of a new biosurfactant by *Bacillus licheniformis*, named
454 lichenysin, which has demonstrated great stability in different temperatures, pH and
455 salt concentrations. Additionally it has shown the capacity of reducing water surface
456 tension from 72 mN/m to 28 mM, with CMC less than or equal to 12mM. Recent
457 studies have revealed that some strains of the *Bacillus megatherium* also produce
458 biosurfactants, classified as glycolipids (Thavasi et al., 2010) or lipopeptides with the
459 ability to reduce water surface tension to 28-30 mN/m, with approximately 100 mg/L
460 CMC (Pueyo et al., 2009).

461 The diversity of microorganisms capable of biodegrading pollutants
462 such as oil and produce biosurfactants is vast and little known. Depending on the
463 studied habitat it is calculated that less than 0.1% and a maximum of 10% of the
464 existing microbial species have been discovered and named. However, the number

465 of identified species, with advances on research, grows every year (Van Hamme et al.,
466 2003).

467

REFERENCES

- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Joshi, S.J., Al-Makhamari, H.S., Al-Sulaimani, H.S., 2012. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration and Biodegradation* xxx, 1-6. doi:10.1016/j.ibiod.2012.01.006
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, 2011. Mancha de óleo teve redução de 12 Km² para 2 Km². OESP, Notebook News of 22/11/2011..
- Aparna, A., Srinikethan, G., Hedge, S., 2011. Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* sps. on Biodegradation of Crude Oil. 2nd International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering, Vol. 6, IACSIT Press, Singapore, pp. 71-75.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Smitha, H., 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23-29.
- Asimiea, O.A., Sam-Wobo, S.O., 2011. The Impact of Hydrocarbon Waste from Brass Oil terminal on the Phytoplankton and Periphyton Communities of Lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 2 (5), 729-733.
- Atlas, R.M., 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4-12), 178-182.
- Bachu, S., 2008. CO₂ storage in geological media: role, means, status and barriers to deployment. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34 (2), 254–273.

492 Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia,
493 L., Smyth, T.J.P., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production,
494 applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (2),
495 427–444.

496 Melo, R.A.M., Cazarin, G.; Augusto, L.G.S., 2007. Doenças hematológicas e
497 situações de risco ambiental: a importância do registro para a vigilância
498 epidemiológica. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 10 (3), 380-390.

499 CETESB. Gerenciamento de Riscos: Resíduos oleosos, tratamento e destinação.
500 Online at [http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-](http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/VazamentodeOleo/231-tratamentoeDestinação)
501 [riscos/VazamentodeOleo/ 231-tratamentoeDestinação](http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/VazamentodeOleo/231-tratamentoeDestinação). Accessed in April/2013.

502 CETESB. Texto explicativo: Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no
503 Estado de São Paulo, 2011, online at
504 [http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2011/texto-explicativo.pdf)
505 [-contaminadas/2011/texto-](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2011/texto-explicativo.pdf)
[explicativo.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2011/texto-explicativo.pdf). Accessed in April/2013.

506 CETESB/GTZ – Projeto de Cooperação técnica Brasil-Alemanha. Manual de
507 gerenciamento de áreas contaminadas, 2001, online at
508 [http://www.cetesb.sp.gov.br/ areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-](http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-ACs/7-)
509 [ACs/7-](http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-ACs/7-). Accessed in April/2013

510 CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente Brasil. Resolução nº 430, 13 Maio
511 2011.

512 Costa A.S., Romão L.P., Araújo B.R., Lucas S.C., Maciel S.T., Wisniewski A.
513 Jr., Alexandre M.R., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic
514 fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource*
515 *Technology*, 105, 31–39.

- 516 Coutinho, R.C.P., Gomes, C.C., 2007. Técnicas para remediação de aquíferos
517 contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de
518 combustíveis. XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, São Paulo-SP,
519 ABRH, 2007.
- 520 Daifullah, A., Girgis, B., 2003 Impact of surface characteristics of activated carbon on
521 adsorption of BTEX. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering
522 Aspects, 214 (1), 181–193.
- 523 Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their
524 commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61 (1), 47–
525 64.
- 526 EPA - Environmental Protection Agency of United States, 2008. Water quality
527 assessment and total maximum daily loads information. Office of Water, U.S.,
528 Washington, DC.
- 529 EPA. Mid-Atlantic Risk Assessment: Risk-Based Concentration, 2012, online at
530 http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/rb-concentration_table/Generic_Table
531 [s/ index.htm](http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/human/rb-concentration_table/Generic_Table/s/index.htm).
- 532 Fellenberg, G. 1980. Introdução aos problemas da poluição ambiental. EPU: São
533 Paulo-SP.
- 534 Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T.J., Banat, I.M., 2010. Production and
535 applications of trehalose lipid biosurfactants. European Journal of Lipid Science
536 and Technology, 112 (6), 617–627.
- 537 Gafarov, A.B, Panov, A.V., Filonov, A.E., Boronin, A.M., 2006. Change in the
538 composition of a bacterial association degrading aromatic compounds during oil
539 sludge detoxification in a continuous-flow microbial reactor. Applied Biochemistry
540 and Microbiology, 42 (2), 160-165.

- 541 Gil, A., Assis, F., Albeniz, S., Korili. S., 2011. Removal of dyes from wastewaters by
542 adsorption on pillared clays. *Chemical Engineering Journal*. 168 (3), 1032–1040.
- 543 Gray, P.H.H., Thornton, H.G., 1928. Soil bacteria that decompose certain aromatic
544 compounds. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Abteilung II*, 73, 74-96.
- 545 Janbandhu, A., Fulekar, M. H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted
546 microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment.
547 *Journal of Hazardous Materials*, 187 (1-3), 333-340.
- 548 Lebrero, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., Quijano, G., 2012. Toluene mass transfer
549 characterization in a biotrickling filter. *Biochemical Engineering Journal*, 60 (1),
550 44-49.
- 551 Lin, C.W., Chen, L.H., Yet-Pole, I., Lai, C.Y., 2010. Microbial communities and
552 biodegradation in lab-scale BTEX-contaminated groundwater remediation using
553 an oxygen-releasing reactive barrier. *Bioprocess and Biosystems Engineering*,
554 33 , 383–391.
- 555 Machado, C. F., 2000. Exercício prático de avaliação e gerenciamento de riscos: O
556 caso dos trabalhadores expostos ao benzeno no Brasil. Brasília: OPS, 2000.
557 350p.
- 558 Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of
559 renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 1 (5), 1-19.
- 560 Mariano, A.P., Kataoka, A.P.A.G., Angelis, D.F., Bonotto, D.M., 2007. Laboratory
561 study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol
562 station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38 (2), 346-353.
- 563 Marques Jr., A.N., Moraes, R.B.C., Maurat, M.C., 2009. *Poluição Marinha*. , 2nd ed.
564 Interciência, Rio de Janeiro - RJ, pp. 505-528.
- 565

- 566 Mazzeo, D.E.C., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A., 2011. Cellular damages in
567 the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after
568 biodegradation process. *Chemosphere*, 85 (1), 13–18.
- 569 Mukherjee, S., Das, P., Sen, R., 2006. Towards commercial production of microbial
570 surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24 (11), 509–515.
- 571 Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P., 2008.
572 Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current*
573 *Science*, 94 (6), 736-747.
- 574 Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., 2008. In situ bioremediation
575 of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology*, 9
576 (13), 5296-5308.
- 577 OESP. O Estado de São Paulo. São Paulo - SP. 2000 a 2013. Diário. ISSN: 1516-
578 294-X.
- 579 Pirôllo, M.P.S., 2006. Estudo da Produção de Biossurfactantes utilizando
580 Hidrocarbonetos. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, 61 p.
- 581 Pirôllo, M.P., Mariano, A.P., Lovaglio, R.B., Costa, S.G., Walter, V., Hausmann,
582 R., Contiero, J., 2008. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI
583 isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *Journal of Applied Microbiology*,
584 105 (5), 1484–1490.
- 585 Pueyo, M.T., Bloch, C. Jr., Carmona-Ribeiro, A.M., Di Mascio, P., 2009. Lipopeptides
586 produced by a soil *Bacillus megatherium* strain. *Microbial Ecology*, 57 (2), 367-
587 378.
- 588 Sette, L.D., Simioni, K.C.M., Vasconcellos, S.P., Dussan, L.J., Neto, E.V.S., Oliveira,
589 V.M., 2007. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs

- 590 from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91 (3), 253-
591 266.
- 592 Seydlová, G., Svobodová, J., 2008. Review of surfactin chemical properties and the
593 potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, 3 (2),
594 123–133.
- 595 Shim, H., Ma, W., Lin, A., Chan, K., 2009. Bio-removal of mixture of benzene,
596 toluene, ethylbenzene, and xylenes / total petroleum hydrocarbons /
597 trichloroethylene from contaminated water. *Journal of Environmental Sciences*.
598 21 (6), 758–763.
- 599 Soberón-Chávez, G., Maier, R.M., 2010. Biosurfactants: a general overview, In:
600 *Biosurfactants: From Genes to Applications*. Soberón-Chávez, G., Springer,
601 Münster, Germany, pp. 1-11.
- 602 Suwansukho, P., Rukachisirikul, V., Kawai, F., H-Kittikun, A., 2008. Production and
603 applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. *Songklanakarin Journal*
604 *of Science Technology*, 30 (1), 87-93.
- 605 Thavasi, R., Banat, I., Jayalakshmi, S., 2011. Biosurfactants from marine bacterial
606 isolates. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied*
607 *Microbiology and Microbial Biotechnology*, Microbiology, Formatex Research
608 Center, Badajoz, Spain, pp. 1367-1373.
- 609 Tondo, D.W., Leopoldino, E.C., Souza, B.S., Micke, G.A., Costa, A.C.O., Fiedler,
610 H.D., Bunton, C.A., Nome, F., 2010. Synthesis of a New Zwitterionic Surfactant
611 Containing an Imidazolium Ring. Evaluating the Chameleon-like Behavior of
612 Zwitterionic Micelles. *Langmuir*, 26 (20), 15754–15760.
- 613 Urum, K., Pekdemir, T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated
614 soil washing. *Chemosphere*, 57 (9), 1139–1150.

- 615 Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum
616 microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 503-549.
- 617 Weltler-Tonini, R.M., Rezende, C.E., Grativol, A.D., 2010. Degradação e
618 Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. *Oecologia*
619 *Australis*, 4 (14), 1010-1020.
- 620 World Health Organization, 2006. Guidelines for drinking-water quality: incorporating
621 first addendum. Recommendations, 3th ed., Vol. 1, 595p.
- 622 Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L., 1995. Characterization of
623 a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant
624 subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied Environmental Microbiology*. 61
625 (5), 1706–1713.
- 626 Yeung, C.W., Law, B.A., Milligan, T.G., Lee, K., Whyte, L.G., Greer, C.W., 2011.
627 Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and
628 sediments from an offshore oil and gas production platform. *Marine Pollution*
629 *Bulletin*, 62 (10), 2095-2105.
- 630 Zobell, C.E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological*
631 *Reviews*, 10 (1-2), p.1-49.

Table 1. Underground water and soil remediation techniques

Technology	Description	Contaminants
Soil vapor extraction (SVE)	It physically removes organic compounds from the unsaturated zone by applying a vacuum system.	CHC, BTEX
Bioventing	It speeds the removal process of volatile organic compounds by venting the vadose zone. It stimulates in-situ bioremediation.	CHC, BTEX
Air Sparging (AIS)	It physically removes volatile and semi-volatile compounds by venting the soil in the saturated zone. It stimulates in-situ bioremediation.	CHC, BTEX, PAH, MTBE
Bio Sparging	It speeds the organic compounds biodegradation by stimulating the native microflora, through physical venting processes of the saturated zone soil.	CHC, BTEX, PAH, MTBE
Pump and Treat	Physical process of extracting contaminated waters from the saturated zone and ex-situ treatment.	CHC, BTEX
Thermal Technology	In-situ thermal processes that destroy contaminants or speed the phase transference of the underground contaminant.	CHC, BTEX
Accelerated Bioremediation	It artificially alters the natural biochemical conditions of underground soil and water to speed degradation caused by microorganisms	CHC, BTEX
Phytoremediation	Appropriate plants are used to promote the extraction/degradation of organic compounds and heavy metals from soil	BTEX, CHC, PAH,
Soil Washing/ Reinjection/ Chemical Processes	Soil washing by proper fluid promotes extirpating and biodegradation. Chemical compounds (e.g. surfactants) can be added to speed the contaminants phase transfer	CHC, BTEX

NOTE: CHC: Chlorinated hydrocarbon compounds; PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons;
BTEX: Petrol Hydrocarbons (Benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes); MTBE: Methyl tert-butyl ether

Table 2. Biosurfactants, producing organisms and their uses

Microorganism	Type of Biosurfactant	Uses
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9	Glycolipid and Trehalose Lipid	Oil spill cleaning operations
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S2	Rhamnolipid	Bioremediation of places contaminated by petroleum
<i>Pseudozyma siamesis</i> CBS9960	Mannosylerythritol Lipid	Promising yeast biosurfactant
<i>Pseudozyma graminicola</i> CBS 10092	Mannosylerythritol Lipid	Washing detergent
<i>Pseudomonas libanensis</i> M9-3	Lipopeptide	Environmental and biomedical uses
<i>Bacillus subtilis</i> ZW-3	Lipopeptide	Pharmaceutical, environment protection, cosmetics and petroleum recovery
<i>Rhodococcus</i> sp. TW53	Lipopeptide	Bioremediation in sea environment
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	Glycolipid	Bioremediation in sea environment
<i>R. wratislaviensis</i> BN 38	Glycolipid	Bioremediation uses
<i>Bacillus subtilis</i> BSS	Lipopeptide	Bioremediation of places contaminated by hydrocarbon
<i>Azobacter chroococcum</i>	Lipopeptide	Environmental uses
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS20	Rhamnolipid	Bioremediation of places contaminated by hydrocarbon
<i>Micrococcus luteus</i> BN56	Trehalose Tetraester	Bioremediation of places contaminated by petroleum
<i>Bacillus subtilis</i> HOB2	Lipopeptide	Petroleum recovery, bioremediation of soil and sea environments and food industry
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 614	Rhamnolipid	Bioremediation
<i>Nocardioopsis alba</i> MSA10	Lipopeptide	Bioremediation
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Rhamnolipid	Environmental uses
<i>Pseudozyma parantarctica</i>	Mannosylmannitol Lipid	Detergent or washing emulsifiers
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Rhamnolipid	Environmental uses
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Lipopeptide	Biologic control agent
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BDS	Lipopeptide	Bioremediation and Biomedicine
<i>Candida bombicola</i>	Sorolipideos	Environmental uses
<i>Brevibacterium aureum</i> MSA13	Lipopeptide	Petroleum recovery
<i>Nocardioopsis lucentencis</i> MSA04	Glycolipid	Bioremediation in sea environment
<i>Bacillus velezensis</i> H3	Lipopeptide	Industrial strain for lipopeptide production
<i>Calyptogenia soyoae</i>	Mannosylerythritol Lipid	Bioremediation in sea environment
<i>Burkholderia plantari</i> DSM 9509	Rhamnolipid	Pharmaceutical and detergent industries

ARTIGO 2

Experimental study of mass transfer coefficient in aerobic fermentation systems: effect of composition of culture media and salinity – Submetido à revista **Aquacultural Engineering**

Elsevier Editorial System(tm) for
Aquacultural Engineering
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Experimental study of mass transfer coefficient in aerobic fermentation systems: effect of composition of culture media and salinity

Article Type: Full Length Article

Keywords: Toluene; Sea water; Oxygen mass transfer coefficient; Agitation; Aeration.

Corresponding Author: Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo

First Author: Ellen C Cristina Souza, master's student

Order of Authors: Ellen C Cristina Souza, master's student; Dante A Moraes, Ph.D.; Thereza Christina Vessoni-Penna, Ph.D.; Attilio Converti, Ph.D.; Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Ph.D.

Abstract: Soil and water are increasingly contaminated mainly due to accelerated industrial growth and lack of appropriate disposal sites for aromatic hydrocarbons such as toluene. Hydrocarbons are lipophilic compounds difficult to be disposed of; however, the aromatic ones can be removed from contaminated environments via bioremediation using surfactant-producing bacteria, which require oxygen and fermentation media for their metabolism. Thus, aeration and agitation are important operating variables to ensure an effective oxygen mass transfer coefficient (kLa). To this purpose, such a response was experimentally determined in this study in different fermentation media, specifically basal saline medium, low saline medium, Bushnell-Hass medium and sea water, and correlated with the above operating variables. In addition, the exponents of the power number (N_3D^2) and superficial gas velocity (V_s) were determined and compared. The best operating conditions were 300 rpm agitation and 1.5 vvm aeration. Salt addition increased osmolarity, while surface tension decreased when surfactin was added to media containing toluene. Toluene addition provided higher values of the exponents of the equation relating kLa to the power number (α) and the superficial velocity (β) in all the media, compared to those containing glucose and yeast extract. The results presented in this study could be used as a baseline for future work focusing on bioremediation processes devoted to the treatment of oil spills using hydrocarbon-degrading microorganisms.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo, June 27th, 2013

Dear Editors,

Please find attached the paper entitled: "Effects of aeration and agitation on oxygen mass transfer coefficient in different media to be used in aerobic bioremediation processes", by Souza et al., which the authors would like to submit to Aquacultural Engineering Journal.

In this study we compared k_La values in different solutions to be used as possible culture media for aerobic bioremediation processes, namely basal saline medium, low saline medium, Bushnell-Hass medium and sea water. In particular, the results obtained in this preliminary work using toluene as a model contaminant could be used as a starting basis for future studies on the treatment of oil spills by hydrocarbon-degrading microorganisms and suggest that optimal operating conditions should be searched to enable efficient bioremediation.

We appreciate any suggestion for the improvement of our article. For us, authors, it would be an honor publishes this work in this renowned journal.

Looking forward to hearing from you, I remain
Yours sincerely

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
University of São Paulo

Reviewer Suggestions

Reviewer 1

Name: Daniela de Araújo Viana Marques

Position: Professor

Department of Biochemistry, Morphology and Physiology

University of Pernambuco - UFRPE

E-mail: daniela_viana@yahoo.com.br

Reason: Prof. Viana Marques has a great expertise in aerobic fermentation bioprocesses, specifically in volumetric mass transfer coefficient studies. In addition, prof. Marques has experience in the area of General Microbiology, Microbiology and Industrial Fermentations, Biochemistry, Biotechnology and Industrial Processes of Chemical Engineering.

Reviewer 2

Name: José Manuel Domínguez-González

Position: Professor

Department of Chemical Engineering

University of Vigo - UVIGO

E-mail: jmanuel@uvigo.es

Reason: Prof. José Manuel Dominguez is scientist-in-chief of the new Laboratory of Biotechnology of the Research, Transfer and Innovation Center of Galician Techno-pole. He has an almost 15-year expertise in various biotechnological research-fields, among which the fermentative bioprocesses with different microorganisms, specifically biosurfactant- producing bacteria. In addition, Prof. González has a great expertise in industrial processes, specifically in operating principles, such as mass transfer, heat transfer, and microbial kinetics.

Reviewer 3

Name: Solange Mussatto, PhD

Position: Professor

University of Minho (Portugal)

E-mail: solange@deb.uminho.pt

Reason: Prof. Mussatto is an expert in biotechnological processes, particularly in fermentation technology and microbial physiology. She has several papers on Biotechnology, Food and Chemical Engineering, all of them related with the development of novel processes and bioreactors, production of chemicals and valorisation of agro-industrial wastes.

- Aeration and agitation were determined in different fermentation media.
- Basal saline medium, low saline medium, Bushnell-Hass medium and sea water were used to determine the exponents of the power number and superficial gas velocity.
- Salt addition increased osmolarity, while surface tension decreased when surfactin was added to media containing toluene.
- The results obtained in this could be used as a starting basis for future studies on the treatment of oil spills by hydrocarbon-degrading microorganisms
- In this work it was suggested that optimal operating conditions should be searched to enable efficient bioremediation.

Experimental study of mass transfer coefficient in aerobic fermentation systems: effect of composition of culture media and salinity

Ellen Cristina Souza^a, Dante Augusto Moraes^a, Thereza Christina Vessoni-Penna^a,
Attilio Converti^b, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira^{a*}

^aBiochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, Genoa University, Via Opera Pia 15, 16145, Genoa, Italy

*Corresponding Author: Ricardo Pinheiro.
Telephone: +55(11) 3091-0123.
E-mail: rpsolive@usp.br

ABSTRACT

Soil and water are increasingly contaminated mainly due to accelerated industrial growth and lack of appropriate disposal sites for aromatic hydrocarbons such as toluene. Hydrocarbons are lipophilic compounds difficult to be disposed of; however, the aromatic ones can be removed from contaminated environments via bioremediation using surfactant-producing bacteria, which require oxygen and fermentation media for their metabolism. Thus, aeration and agitation are important operating variables to ensure an effective oxygen mass transfer coefficient (k_La). To this purpose, such a response was experimentally determined in this study in different fermentation media, specifically basal saline medium, low saline medium, Bushnell-Hass medium and sea water, and correlated with the above operating variables. In addition, the exponents of the power number (N^3D^2) and superficial gas velocity (V_s) were determined and compared. The best operating conditions were 300 rpm agitation and 1.5 vvm aeration. Salt addition increased osmolarity, while surface tension decreased when surfactin was added to media containing toluene. Toluene addition provided higher values of the exponents of the equation relating k_La to the power number (α) and the superficial velocity (β) in all the media, compared to those containing glucose and yeast extract. The results presented in this study could be used as a baseline for future work focusing on bioremediation processes devoted to the treatment of oil spills using hydrocarbon-degrading microorganisms.

Key Words: Toluene; Sea water; Oxygen mass transfer coefficient; Agitation; Aeration

1. Introduction

Accelerated industrial growth and lack of appropriate disposal sites for chemical wastes have increased soil and water contamination. Particularly aromatic hydrocarbons such as toluene, which are produced in large quantities by the oil industry, are often incorrectly used and illegally dumped, contaminating soil, groundwater, surface water, biota and even air (Farhadian et al., 2010; Lebrero et al., 2012). According to Yeung et al. (2011), one liter of oil can deplete the oxygen from one million liters of water, and can form a 1000 m² thin layer in a few days, thereby preventing light and water passage and then inhibiting plant and microbial growth.

Potentially harmful effects to human health caused by hydrocarbons are linked to their physicochemical properties such as lipophilicity, which enables them to be absorbed by skin and distributed throughout the body when ingested or inhaled (Costa et al., 2012). According to other studies, toluene primarily affects the human central nervous system, causing excitement or depression with euphoria at the induction phase, followed by disorientation, tremors, hallucinations, convulsions and coma. Abnormal enzyme activity in liver and kidney has also been observed (Asimiea and Sam-Wobo, 2012; Zhang et al., 2013).

Oil-contaminated sites can be decontaminated via the so-called bioremediation. This technique consists of hydrocarbon biodegradation by micro-organisms using such pollutants as carbon source for energy, biodegrading them into carbon dioxide, water, minerals and gases (Banat et al., 2010).

The low solubility and high hydrophobicity of many hydrocarbons make them highly unavailable to micro-organisms, that in order to use them as a carbon source, they produce a substance called biosurfactant (Aparna et al., 2012), during the fermentation process.

The volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_La) is the most important parameter in all the aerobic bioprocesses (Galaction et al., 2004), its values being influenced by a number of factors, among which are the agitation level, bioreactor features, media composition, and the concentration and type of microorganisms (Jamnongwong et al., 2010); but, above all, oxygen mass transfer plays a key role in bioreactors because it controls the oxygen available for microbial metabolism;

therefore, k_{La} may be used as an indicator in wastewater treatment as well as in various fermentation and bioremediation processes (Mineta et al., 2011).

Biological processes are usually performed in culture broths containing salts, organic nutrients such as sugars, hydrocarbons or alcohols and sometimes surfactants, which are far more complex than clean water (Kaczorek et al., 2010). Therefore, studies on gas–liquid mass transfer in bioprocesses have become increasingly necessary (Kashid et al., 2011). Several authors have recently reported that advancing bioreactor designs is still a high priority to solve environmental problems and increase oxygen transfer from the gas phase to microorganisms (Kashid et al., 2011; Sabrina et al., 2012).

Toluene is a monoaromatic hydrocarbon, ideal for biodegradation studies. This aromatic compound is produced in large quantities, used as a fuel or solvent and as raw material for producing plastics, synthetic fibers and pesticides (Farhadian et al., 2010). Usually in mixtures, monoaromatics have become prevalent environmental contaminants due to spills and leakage from tanks and other containers.

The biosurfactants, produced by microorganisms for the removal of environmental contaminants, are polymers wholly or partly extracellular, which accumulate at interfaces with different polarities. This feature allows blocking the formation of hydrogen bridges and certain hydrophobic-hydrophilic interactions, which cause molecular rearrangement and reduce the surface tension of the liquid (Aparna et al., 2012). Therefore, biosurfactant production is assessed indirectly by surface tension, according to Pirôllo et al. (2008), relates to the forces of attraction and repulsion between molecules of a fluid.

For bioremediation to be successful, knowledge of k_{La} is required. In this work, we investigated the effects of aeration and agitation on k_{La} in media with different salinity composition, for their possible use in aerobic bioremediation processes, either in the presence of toluene as a carbon source or not. And then examining the influence of salinity with different concentrations of surfactin standard (Sigma) to check a correlation between these conditions the removal of toluene from saline media studied. Understanding these effects is necessary to perform further work dedicated to the selection of optimal conditions for effective activity of micro-organisms that degrade hydrocarbons.

2. Materials and Methods

2.1 Fermentation media

We used four used 4 different culture media with different salinities, denominated basal saline medium (BSM), low saline medium (LSM), Bushnell-Haas medium (BHM) and media simulating sea water (SW), whose compositions are detailed in Table 1.

2.2 Fermentor

All the experiments were conducted at $30\pm1^{\circ}\text{C}$ in a 2 L bench-scale bioreactor, model BioFlo[®]/Celligen[®]115 (New Brunswick - Enfield, CT, USA), equipped with an electronic device to control temperature, dissolved oxygen level, rotational speed and aeration. The main bench-scale design details were as follows: operating volume, 1.0 L; internal diameter, 12 cm; height, 18.5 cm; number of baffles, 3; baffle height, 14 cm; baffle width, 2.3 cm; number of impellers, 2; impeller distance from the top plate, 12 cm; impeller distance from the bottom plate, 5 cm; impeller type, Rushton disc turbine; impeller disc diameter, 5.0 cm; impeller blade width, 1.5 cm; impeller blade length, 1.5 cm; number of blades, 6.

2.3 Osmolarity

Osmolarity of the media, expressed in mOsmol/L, was measured using micro-osmometer cryoscopic Ganotec (Osmomat 030) determined by the freezing point of 50 μL of each sample. The equipment was calibrated with a standard solution of equipment (300 Osm/kg NaCl) using distilled water as a control.

2.4 k_{La} determination

k_{La} value was determined on all the culture media studied, these being supplemented or not supplemented with 2% glucose, 5% yeast extract and 3% toluene; without the presence of micro-organisms under three different conditions of aeration

(0.5, 1.0 and 1.5 vvm) and agitation four different conditions (50, 100, 200 and 300 rpm), expressed in s⁻¹.

To this purpose, the dissolved oxygen was removed by injecting nitrogen (N₂), and the decreasing oxygen concentration measured through a sensor. After the oxygen concentration reached approximately 0% saturation at 30°C, N₂ injection was stopped, and the bubbling of air was started. Oxygen concentration was newly monitored every 30 s until reaching approximately 100% saturation (saturation point).

According to the literature (Ozbek and Gayik, 2011), the mass balance of dissolved oxygen in well-mixed liquid phase can be described as:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (1)$$

where dC/dt is the rate of O₂ accumulation rate in the liquid phase (g m⁻³ s⁻¹) and C^* the oxygen saturation concentration (g/m³) in a given medium.

Integration of this equation gives:

$$\ln \left(1 - \frac{C}{C^*} \right) = K_L a \cdot t \quad (2)$$

$k_L a$ value was then estimated as the slope of the straight line obtained plotting the experimental data of $\ln (1 - C/C^*)$ versus time, after deletion of random points.

2.5 Correlation of $k_L a$ with operating variables

$k_L a$ can be related to the power number ($N^3 D^2$) and the gas sparging rate expressed as superficial velocity (V_s) (m/s) by the equation (Garcia-Ochoa and Gomez, 2004; Richards, 1961):

$$k_L a = A(N^3 D^2)^\alpha [V_s]^\beta \quad (3)$$

where N (s⁻¹) is the impeller speed, D the impeller diameter (m), A a constant, and α and β are empirical exponents to be experimentally determined under each condition.

2.6 Standard curve of surfactants

First, surfactin from *Bacillus subtilis* (catalog number S3523, Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil) was diluted with distilled water up to a concentration of 1 mg/mL. Then, 2 ml each of the culture media studied were transferred to twelve 5 ml test tubes, in six tubes were added 3% toluene. Surfactin was then added at different concentrations (5, 10, 50, 100, 200, and 500 µg/L) in either toluene-free or toluene-containing media. The samples were placed in a shaker, model G-25KC (New Brunswick) at 30 °C and 200 rpm and surface tension of the culture media was measured at the initial time (0 hour) and end time (48 h) cultivation.

3. Results and discussion

3.1 Volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_{La})

The coefficient of mass transfer of oxygen is the most important parameter implicit in the aerobic bioprocess. Therefore, knowledge of the volumetric coefficient of mass transfer (k_{La}) is extremely important to get success for a fermentation process. Particularly k_{La} values are affected by various characteristics of bioreactors, composition of culture media, the type and concentration of micro-organisms. In addition, the mass transfer of oxygen plays a fundamental role in the control of oxygen available for the metabolism of microorganisms in bioreactors.

In this part of the study, the effects of broth composition, salinity and surfactant concentration on the volumetric mass transfer coefficient (k_{La} , s⁻¹) and osmolarity (mOsm/L) were evaluated in all tested media, under different conditions of aeration and agitation (Table 2). As expected from general knowledge on oxygen distribution in liquids, in all the tested media, the best operating conditions, i.e. those ensuring the highest k_{La} values, were obtained at the highest levels of both agitation (300 rpm) and aeration (1.5 vvm). When comparing k_{La} and osmolarity values, in general they appear to be inversely related, even though a strict correlation between these two parameters cannot be established.

The lowest k_{La} values and the highest rates of osmolarity, were always observed in media containing yeast extract (Table 2), likely due to its well-known colloidal nature

and viscosity-raising activity, both features that tend to decrease O_2 solubility. In fact, taking mean values to make comparison easier, under 300 rpm agitation and 1.5 vvm aeration k_La was 0.018 s^{-1} in non-supplemented media, with yeast extract this constant was reduced to 0.012 s^{-1} , was maintained at 0.018 s^{-1} for glucose and reduced to 0.016 s^{-1} in the media containing toluene. This reduction, less pronounced, was exerted by toluene in low saline (LSM), Bushnell-Hass (BHM) and sea water (SW) media, likely due to the hydrophobic nature of this solute. It's important emphasize that the range of k_La values obtained in this study (Table 2) are in agreement with data reported by several authors in the literature, ranging from 0.001 to 0.020 s^{-1} (Galaction et al., 2004; Garcia-Ochoa and Gomez, 2004).

In all cases the osmolarity increased with salt concentration, being 4.12 , 4.89, and 8.15 times higher in SW than in BSM, BHM and LSM, respectively. Indeed, this behavior should be expected from the well-known effect of salts on osmotic pressure, which is much stronger than that exerted by organic compounds.

3.2 Dimensionless correlations for predicting k_La

In distilled water, the values of α (0.132) and β (0.506) of Eq. (3) (Table 3), which represent the slopes of the straight lines correlating $\ln k_La$ to $\ln N^3 D^2$ and $\ln V_s$, respectively, fell within the very wide ranges of values reported in the literature for water and different liquid solutions ($0.1 \leq \alpha \leq 0.7$ and $0.3 \leq \beta \leq 0.8$) in differently shaped bioreactors and under quite different operating conditions (Marques et al., 2009; Ozbek and Gayik, 2004; Puthli et al., 2005). A suggested, this difference may be due to different bioreactor designs, media properties and operating conditions (Garcia-Ochoa and Gomez, 2004)

In the present study, the values of α and β in BSM, LSM, BHM and SW supplemented with glucose, yeast extract and toluene were statistically significantly higher than their respective values in the absence of these compounds (Table 3), likely because their presence in the liquid phase altered the physicochemical properties of the bulk and then affected oxygen mass transfer (Farhadian et al., 2010; Jamnongwong et al., 2010; Marques et al., 2009). Such increases were particularly high in the presence of toluene ($\alpha = 0.306, 0.363, 0.344, 0.237$ and $\beta = 0.968, 0.974, 1.052$ and 1.056 , for BSM, LSM, BHM and SW, respectively), whose hydrophobicity may have promoted

bubble coalescence leading to larger bubbles and decreasing the interfacial area (9, 20). In contrast, agitation is well known to influence air bubble distribution and mixing, in that insufficient agitation results in poor oxygen transfer, especially in highly viscous media (Marques et al., 2009).

3.3 Effect of surfactin and toluene on media surface tension

Fig 1 shows the simultaneous influence of the presence of toluene and the surfactin concentration on the surface tension of the tested media. As we can see for distilled water taken as a reference (Fig. 1A), a progressive increase in surfactin concentration led to a corresponding decrease in surface tension, as the likely result of micelle formation. When toluene was added as well, the interactions in the bulk became more dispersed, and the surface tension decreased even more.

The same procedure was performed in different saline media, so it was evaluated the influence of salinity on the action of surfactin, except in BSM media, which was inferior to the BHM media. According to Abdel-Mawgoud et al. (2008), the study of the effect of salinity on the activity of the biosurfactant is necessary to investigate their possible application in bioremediation of contaminated marine environments.

In the experiments, it was observed that the presence of salt interferes in the hydrocarbon-biosurfactant interaction. Even in LSM media (11 mOsmol/L) with low salinity, was an increase in the surface tension from 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of surfactin samples in the presence of toluene, relative to the beginning of the test (Fig. 1B).

Whereas LSM behaved almost identically to distilled water, the Bushnell-Haas one (110 mOsmol/L) showed substantially higher surface tension under all the tested conditions (Fig. 1C). For instance, after 48 hours, in the presence of 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ surfactin and 3% toluene, the surface tension (35.6 dyn/cm) was approximately 55% higher than in distilled water. As suggested by Hanna et al., (2005), the presence of salt in the solution favors the formation of more and larger sized micelles that are added vertically as a stem, encapsulating more hydrocarbon molecules. Such an improved aggregation capability of the surfactant was confirmed by Zhai et al. (2006), who observed, without salts, the formation of simple spherical micelles, whereas larger vesicles formed with salts at an even lower biosurfactant concentration.

This may have favored toluene dispersion and solubilization, increasing the surface tension after 48 hours. Such an occurrence did not take place in the LSM, especially at low biosurfactant concentrations (5 and 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), probably because the overall salt concentration was not enough to favor micelle formation under these conditions. Similarly, Tabatabaee et al., (2005) observed that, without salt, the surface tension decreased throughout the runs, whereas it increased the surface tension in accordance with the salt concentration. On the contrary, Haghighat et al (2008), who assessed the effect of different NaCl concentrations (2-20%) on the biosurfactants synthesized by *B. subtilis* and *B. licheniformis*, found that the presence of salt did not significantly influence the surface tension, even at high concentrations (20%).

Fig. 1D shows the surface tension values detected in SW. It is noteworthy that, at the end of the runs, SW exhibited 8% higher surface tension than LSM (Figure 1B) in the presence of 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ surfactin and 3% toluene. According to 22, surfactin activity remains almost constant up to 6% NaCl concentration, a value which is about twice that of SW (approximately 3%). So, the results observed in SW (Fig. 1D) may be explained by enhanced toluene solubilization due to the formation of large vesicle rather than micelle in the presence of salts (Zhai et al., 2006). With toluene solubilization facilitated by vesicles, there may have been leftover surfactin monomers that reduced the surface tension (Urum and Pekdemir, 2004).

Resuming, the highest toluene removals by the biosurfactant, corresponding to the lowest values of surface tension, occurred at the end of every runs at highest surfactin concentration (500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in all the tested media, specifically: a) distilled water, 23.3 dyn/cm; b) low saline medium, 24.4 dyn/cm; c) Bushnell-Haas medium, 31.4 dyn/cm; and d) sea water, 25.6 dyn/cm.

4. Conclusions

In this study we compared k_La values in different solutions to be used as possible culture media for aerobic bioremediation processes, namely basal saline medium, low saline medium, Bushnell-Haas media and the media simulating sea water. The best operating conditions were 300 rpm agitation and 1.5 vvm aeration, where maximum k_La values were obtained. Salt addition increased osmolarity, while surface tension decreased when surfactin was added to media containing toluene. Toluene addition

provided higher values of the exponents of the equation relating k_{La} to the power number (α) and the superficial velocity (β) in all the media, compared to those containing glucose and yeast extract. The results obtained in this preliminary work using toluene as a model contaminant could be used as a starting basis for future studies on the treatment of oil spills by hydrocarbon-degrading microorganisms through production of biosurfactants and suggest that optimal operating conditions should be searched to enable efficient bioremediation.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support by the Brazilian research funding institutions FAPESP and CNPq (151403/2011-2).

References

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H., 2008. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. Appl. Biochem. Biotech. 150, 289–303.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Smitha, H., 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. Colloids Surf. B Biointerfaces 95, 23–29.
- Asimiea, O.A., Sam-Wobo, S.O., 2011. The impact of hydrocarbon waste from brass oil terminal on the phytoplankton and periphyton communities of Lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. J. Emerg. Trends Eng. Appl. Sci. 2, 729–733.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T. J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 427–444.
- Costa, A. S., Romão, L.P.C., Araújo, B.R., Lucas, S.C.O., Maciel, S. T. A., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. Bioresour. Technol. 105, 31–39 ().
- Farhadian, M., Duchez, D., Gaudet, G., Larroche, C., 2010. Biodegradation of toluene at high initial concentration in an organic–aqueous phase bioprocess with nitrate respiration. Process Biochem. 45, 1758–1762.

- Galaction, A.I., Cascaval, D., Oniscu, C., Turne, M., 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths, *Biochem. Eng. J.* 20, 85–94.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., 2004. Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* 59, 2489–2501.
- Haghighat, S., Sepahy, A.A., Assadi, M.M., Pasdar, H., 2008 Ability of indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil recovery. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 5, 385-390.
- Hanna, K., Denoyel, R., Beurroides, I., Dubès, J.P., 2005. Solubilization of pentachlorophenol in micelles and confined surfactant phases. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 254, 231-239.
- Jamnongwong, M., Loubiere, K., Dietrich, N., Hébrard, G., 2010. Experimental study of oxygen diffusion coefficients in clean water containing salt, glucose or surfactant: Consequences on the liquid-side mass transfer coefficients. *Chem. Eng. J.* 165, 758–768.
- Kaczorek, E., Urbanowicz, M., Olszanowski, A., 2010. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 81, 363-368.
- Kashid, M.N., Renken, A. Kiwi-Minsker, L., 2011. Gas–liquid and liquid–liquid mass transfer in microstructured reactors. *Chem. Eng. Sci.* 66, 3876-3897.
- Lebrero, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., Quijano, G., 2012. Toluene mass transfer characterization in a biotrickling filter. *Biochem. Eng. J.* 60, 44-49.
- Marques, D.A.V., Torres, B.R., Porto, A.L.F., Pessoa-Júnior, A., Converti, A., 2009. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 47, 122–126.
- Mineta, R., Salehi, Z., Yoshikawa, H., Kawase, Y., 2011. Oxygen transfer during aerobic biodegradation of pollutants in a dense activated sludge slurry bubble column: Actual volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen uptake rate in *p*-nitrophenol degradation by acclimated waste activated sludge. *Biochem. Eng. J.* 53, 266-274.
- Ozbek, B., Gayik, S., 2011. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochem.* 36, 729–741.

- Pirôllo, M.P.S., Mariano, A.P., Lovaglio, R.B., Costa, S.G., Walter, V., Hausmann, R., Contiero, J., 2008. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1484–1490.
- Puthli, M.S., Rathod, V.K., Pandit, A.B., 2005. Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 23, 25–30.
- Richards, J.W. 1961. Studies in aeration and agitation. *Prog. Ind. Microbiol.* 3, 143–172.
- Sabrina, N., Mutamim, A., Noor, Z.Z., Hassan, M.A.A., Olsson, G., 2012. Application of membrane bioreactor technology in treating high strength industrial wastewater: a performance review. *Desalination* 305, 1-11.
- Tabatabaee, A., Assadi, M.M., Noohi, A.A., Sajadian, V.A., 2005. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian J. Env. Health. Sci. Eng.* 2, 6-12.
- Urum, K., Pekdemir, T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57, 1139–1150.
- Yeung, C.W., Law, B.A., Milligan, T.G., Lee, K., Whyte, L.G. Greer, C.W., 2011. Analysis of bacterial diversity and metals in produced water, seawater and sediments from an offshore oil and gas production platform. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2095-2105.
- Zhai, L., Tana, X., Lia, T., Chena, Y., Huang, X., 2006. Influence of salt and polymer on the critical vesicle concentration in aqueous mixture of zwitterionic/anionic surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 276, 28-33.
- Zhang, L., Zhang, C., Cheng, Z., Yao, Y., Chen, J., 2013. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. *Chemosphere* 90, 1340-1347.

Figure captions

Figure 1. Surface tension values in distilled water (A), low saline medium (B), Bushnell-Haas media (C) and sea water (D) with or without 3% toluene, in the presence of surfactin at different concentrations ($\mu\text{g/L}$): ■ 0; ■ 5; ■ 10; ■ 50; ■ 100; ■ 200; ■ 500. Mean values ($n = 3$) $\pm$ standard deviations determined at the beginning ($t_0 = 0$ h) and the end ($t_f = 48$ h) of each run. Different letters in the same column mean statistically significant differences among values of the same parameter ($P < 0.05$).

Figure(1)

Table 1. Composition of culture media: sea water (SW), basal saline medium (BSM), Bushnell-Haas medium (BHM) and low saline medium (LSM).

Composition of culture medium (mg / L)							
SW		BSM		BHM		LSM	
NaCl	27,6	MgSO ₄ .7H ₂ O	50,0	CaCl ₂ .2H ₂ O	23,0	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	6,9	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0	MgSO ₄	20,0	MgSO ₄	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	5,4	KCl	10,0	KH ₂ PO ₄	61,0	KH ₂ PO ₄	6,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,4	NaNO ₃	40,0	K ₂ HPO ₄	55,0	K ₂ HPO ₄	5,5
KCl	0,6	KH ₂ PO ₄	50,0	NH ₄ NO ₃	50,0	NH ₄ NO ₃	5,0
NaHCO ₃	0,2	K ₂ HPO ₄	65,0	FeCl ₃	69,0	FeCl ₃	6,9
KBr	0,03	FeSO ₄ .7H ₂ O	10,2	-	-	-	-
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,02	-	-	-	-	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01	-	-	-	-	-	-
NaHPO ₄	0,01	-	-	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001	-	-	-	-	-	-

Table(2)

Table 2. Values of oxygen mass transfer coefficient (k_La , s^{-1}), agitation (rpm), aeration (vvm) and osmolarity (mOsm/L) in water (W), basal saline medium (BSM), low saline medium (LSM), Bushnell-Hass medium (BHM) and sea water (SW). (Glu) Samples supplemented with 2% glucose; (YE) samples supplemented with 5% yeast extract; (Tol) samples supplemented with 3% toluene.

Sample	k_La (s^{-1})					Osmolarity (mOsmol/L)
	rpm vvm	50	100	200	300	
W	0,5	0,004	0,004	0,008	0,019	0,0
	1,0	0,005	0,006	0,010	0,015	
	1,5	0,007	0,010	0,012	0,019	
BSM	0,5	0,003	0,004	0,005	0,007	104,0
	1,0	0,006	0,005	0,008	0,013	
	1,5	0,008	0,008	0,010	0,017	
BSM + Glu	0,5	0,004	0,004	0,006	0,010	229,0
	1,0	0,006	0,006	0,009	0,015	
	1,5	0,008	0,008	0,011	0,018	
BSM + YE	0,5	0,003	0,003	0,004	0,007	452,0
	1,0	0,003	0,004	0,006	0,013	
	1,5	0,005	0,008	0,009	0,011	
LSM	0,5	0,004	0,003	0,003	0,009	11,0
	1,0	0,006	0,008	0,011	0,018	
	1,5	0,008	0,007	0,008	0,016	
LSM + Glu	0,5	0,005	0,003	0,006	0,010	130,0
	1,0	0,006	0,006	0,009	0,014	
	1,5	0,008	0,007	0,009	0,017	
LSM + YE	0,5	0,003	0,004	0,004	0,007	323,0
	1,0	0,002	0,005	0,006	0,009	
	1,5	0,005	0,005	0,008	0,011	
BHM	0,5	0,004	0,004	0,009	0,008	110,0
	1,0	0,006	0,006	0,011	0,016	
	1,5	0,010	0,010	0,013	0,020	
BHM + Glu	0,5	0,004	0,004	0,006	0,011	247,0
	1,0	0,007	0,007	0,009	0,016	
	1,5	0,009	0,009	0,011	0,018	
BHM + YE	0,5	0,003	0,003	0,004	0,009	359,0
	1,0	0,004	0,005	0,006	0,009	
	1,5	0,006	0,008	0,009	0,012	
SW	0,5	0,005	0,004	0,007	0,010	1100,0
	1,0	0,006	0,007	0,010	0,016	
	1,5	0,009	0,008	0,012	0,018	
SW + Glu	0,5	0,003	0,004	0,006	0,009	1275,0
	1,0	0,006	0,006	0,010	0,015	
	1,5	0,008	0,009	0,013	0,021	
SW + YE	0,5	0,003	0,004	0,006	0,009	1386,0
	1,0	0,004	0,005	0,006	0,013	
	1,5	0,005	0,006	0,007	0,014	
BSM + Tol	0,5	0,003	0,003	0,005	0,010	0162,0
	1,0	0,005	0,005	0,007	0,013	
	1,5	0,007	0,007	0,008	0,015	
LSM + Tol	0,5	0,004	0,003	0,006	0,009	65,0
	1,0	0,005	0,003	0,011	0,016	
	1,5	0,005	0,007	0,012	0,017	
BHM + Tol	0,5	0,002	0,002	0,005	0,010	107,0
	1,0	0,006	0,005	0,005	0,015	
	1,5	0,005	0,007	0,007	0,017	
SW + Tol	0,5	0,002	0,001	0,004	0,008	1088,0
	1,0	0,003	0,004	0,006	0,010	
	1,5	0,005	0,007	0,012	0,016	

Table 3. Estimated correlation coefficients α and β in Eq. (3) for water (W), basal saline medium (BSM), low saline medium (LSM), Bushnell-Hass medium (BHM) and sea water (SW). (Glu) Samples supplemented with 2% glucose; (YE) samples supplemented with 5% yeast extract; (Tol) samples supplemented with 3% toluene. Different letters mean statistically significant difference according to the test of Tukey ($\alpha < 0.05$).

Sample	α	β	R^2
W	0.132 ^a	0.506 ^a	0,995
BSM	0.162 ^b	0.606 ^d	0,969
BSM + Glu	0.185 ^d	0.622 ^e	0,979
BSM + YE	0.301 ^l	0.654 ^k	0,988
BSM + Tol	0.306 ^m	0.968 ^m	0,979
LSM	0.195 ^f	0.869 ^j	0,997
LSM + Glu	0.230 ⁱ	0.879 ^k	0,981
LSM + YE	0.245 ^k	0.892 ^l	0,985
LSM + Tol	0.363 ^o	0.974 ^m	0,989
BHM	0.173 ^c	0.510 ^b	0,966
BHM + Glu	0.200 ^g	0.697 ^g	0,998
BHM + YE	0.208 ^h	0.771 ^h	0,991
BHM + Tol	0.344 ⁿ	1.052 ⁿ	0,987
SW	0.179 ^d	0.545 ^c	0,968
SW + Glu	0.178 ^d	0.802 ⁱ	0,989
SW + YE	0.193 ^f	0.877 ^k	0,998
SW + Tol	0.237 ^j	1.056 ⁿ	0,988

ARTIGO 3

Influence of toluene and salinity on biosurfactants production by different *Bacillus* strains: scale up from shaker to bench bioreactor – Submetido à revista **Bioresource Technology**

Elsevier Editorial System(tm) for Bioresource Technology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Influence of toluene and salinity on biosurfactants production by different *Bacillus* strains: scale up from shaker to bench bioreactor

Article Type: Original research paper

Keywords: Keywords: Toluene; Biosurfactant production, Saline media; *Bacillus subtilis*, Bioremediation.

Corresponding Author: Dr Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Ph.D Corresponding Author's Institution:

University of São Paulo

First Author: Ellen C Souza, Master's student

Order of Authors: Ellen C Souza, Master's student; Thereza Christina Vessoni-Penna, Ph.D; Dante A Moraes, Ph.D; José Manuel Domínguez González, Ph.D; Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Ph.D

Abstract: Rotary shaker essays were performed to select, among different bacteria, namely *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium* and *Bacillus licheniformis*, the best biosurfactant producer in the presence of toluene, in fermentative broths formulated with different salinities. The presence of toluene inhibited the growth of microorganism shifting the metabolism to the production of biosurfactant. Thus, *B. subtilis* was able to reduce the surface tension (ST) in 29.49 ± 0.55 units producing up to 3.52 ± 0.06 mg L⁻¹ of biosurfactant. Scaling up the process to a bench fermentor, the quantity of toluene in the low salinity medium was reduced drastically after 12 h of growth (from 45 mL to 7.43 mL), when *B. subtilis* was used, reducing the ST in 22.6 units (biosurfactant concentration of 3.02 mg L⁻¹). The results obtained showed that *B. subtilis* can be considered a promising microorganism to be used for the bioremediation of sites contaminated by toluene.

Suggested Reviewers: Attilio Converti Ph.D

Professor, Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genoa
converti@unige.it

Prof. Converti is scientist-in-chief of the new Laboratory of Biotechnology of the Research, Transfer and Innovation Center of Chemical Engineering Pole. He has an almost 30-year expertise in various biotechnological research-fields, among which the fermentative bioprocesses with different microorganisms, specifically biosurfactant-producing bacteria. In addition, Prof. González has a great expertise in industrial processes, specifically in operating principles, such as mass transfer, heat transfer, and microbial kinetics.

Daniela Marques Ph.D

Professor, Department of Biochemistry, Morphology and Physiology , University of Pernambuco - UFRPE
daniela_viana@yahoo.com.br

Prof. Viana Marques has a great expertise in aerobic fermentation bioprocesses, specifically in volumetric mass transfer coefficient studies. In addition, prof. Marques has experience in the area of General Microbiology, Microbiology and Industrial Fermentations, Biochemistry, Biotechnology and Industrial Processes of Chemical Engineering.

Manuel Vázquez Vázquez Ph.D

Professor, Department of Analytical Chemistry , University of Santiago de Compostela
manuel.vazquez@usc.es

Prof. Vazquez has a deep understanding in bioreactor design. He works in the following themes: pharmaceutical biotechnology - biotechnological processes, with emphasis in fermentation, production, purification and application of biomolecules of industrial interest.

Paula Marques Ph.D

Professor, Renewable Energies Department, INETI - National Institute of Engineering Technology and Innovation

paula.marques@ineti.pt

Professor Paula Marques has an expertise in heavy metals removal from aqueous solution by immobilised yeast.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

São Paulo, June 13th, 2013

Dear Editor Dr. **Pandey**,

Please find attached the paper entitled: "Influence of toluene and salinity on biosurfactants production by different *Bacillus* strains: scale up from shaker to bench bioreactor", by Souza et al., which the authors would like to submit to Bioresource Technology.

The authors declare that the work described has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

We appreciate any suggestion for the improvement of our article. For us, authors, it would be an honor publishes our work in this renowned journal.

Looking forward to hearing from you, I remain
Yours sincerely

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
University of São Paulo

Highlights

- The presence of toluene inhibited the growth of microorganisms
- The formation of micelles (vesicles) promotes the breakdown of the hydrocarbon molecules
- *Bacillus subtilis* was the best biosurfactant producer in the presence of toluene
- *B. subtilis* can be considered a promising microorganism to be used for the bioremediation

**Influence of toluene and salinity on biosurfactants production
by different *Bacillus* strains: scale up from shaker to bench
bioreactor**

Ellen Cristina Souza^{a*}, Thereza Christina Vessoni-Penna^a, Dante Augusto
Moraes^a, José Manuel Domínguez González^b, Ricardo Pinheiro de Souza
Oliveira^a

*^aBiochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av Prof Lineu Prestes, 580, Bl
16, 05508-900, São Paulo, Brazil*

*^bDepartment of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, Vigo University,
Campus of Ourense, As Lagoas s/n, 32004 Ourense, Spain*

*Corresponding Author: Ricardo Pinheiro.
Telephone: +55(11) 3091-2478.
E-mail: rpsolive@usp.br

ABSTRACT

Rotary shaker essays were performed to select, among different bacteria, namely *Bacillus megatherium*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, the best biosurfactant producer in the presence of toluene, in fermentative broths formulated with different salinities. The presence of toluene inhibited the growth of microorganism shifting the metabolism to the production of biosurfactant. Thus, *B. subtilis* was able to reduce the surface tension (ST) in 29.49 ± 0.55 units producing up to $3.52 \pm 0.06 \text{ mg L}^{-1}$ of biosurfactant. Scaling up the process to a bench fermentor, the quantity of toluene in the low salinity medium was reduced drastically after 12 h of growth (from 45 mL to 7.43 mL), when *B. subtilis* was used, reducing the ST in 22.6 units (biosurfactant concentration of 3.02 mg L^{-1}). The results obtained showed that *B. subtilis* can be considered a promising microorganism to be used for the bioremediation of sites contaminated by toluene.

Keywords: Toluene; Biosurfactant production, Saline media; *Bacillus subtilis*, Bioremediation.

1. INTRODUCTION

Concerns related to the potential contamination of soil and water by oil and its derivatives has been gradually increasing. There are several origins for contamination: accident in the transportation of fuels by ships and trucks; leaking from underground storage tanks, such as the ones used in gas stations, which are subjected to corrosion; oil extraction and processing operation; and inadequate release of oily residues produced by industries that use oil derivatives in the production of plastics, solvents, pharmaceutical products, cosmetics, etc (EPA, 2008).

The residues produced by such industries are composed by oils, fats, organic compounds and metals. Among the organic compounds there are alkanes, cycloalkanes, benzene, toluene, xylene, phenol and polycyclic aromatic hydrocarbons (Di Martino et al., 2012). Many of these compounds are considered extremely pollutant because, besides being toxic, they present carcinogenic and mutagenic potential to human beings (Janbandhu and Fulekar, 2011).

The sea environment has been suffering constant oil spills, where petroleum is the most abundant organic contaminant in the ocean, and the leaking of thousands of tons of petroleum contaminating the ocean has been constantly reported by media (OESP, 2000 to 2013).

In Brazil, one of the most impactful spills recently took place in November 2011, when there was a large petroleum leaking from the Sedco 706 platform,

operated by Chevron, in Bacia de Campos (Rio de Janeiro), reaching up to 594.3 thousand liters, reaching about 163 Km² (ANP, 2011).

Gasoline and diesel have hydrocarbons from the BTEX group (benzene, toluene, ethylbenzene and xylens) in their composition, which are the first ones to reach groundwater, due to their high solubility in water (Mariano, 2007). As a consequence, such highly-toxic compounds (except for ethylbenzene) are the major causes of death by toxicity (Di Martino et al., 2012).

Fellenberg (1980) has already described that petroleum and its derivatives, when in contact with water, spread creating a thin pellicle on the surface that prevents gas exchange between the air and water and light from reaching phytoplankton, compromising the food chain. Confirming such theory, Asimiea and Sam-Wobo (2001) observed the impact of hydrocarbons residues on phytoplankton communities, which suffered structural changes due to the presence of such compounds.

The potential threat of hydrocarbons to human health is linked to their physical and chemical properties, which allows such compounds to be absorbed by the skin, if ingested or inhaled, and quickly spread through the organism (Costa et al., 2012).

Toluene presents moderate systemic toxicity for human beings. When ingested, toluene is completely absorbed by the gastrointestinal tract system, and it quickly spreads through the body, especially the fatty tissues, and it is metabolized and excreted through the urine. When inhaled, the hydrocarbon compromises the central nervous system, causing excitement or depression, with euphoria in the induction stage, and further disorientation, tremors, dismay,

1 hallucinations, convulsions and coma; it can cause electrolytic alterations,
2
3 metabolic acidosis, heart arrhythmia and muscle weakness. It also causes
4
5 irritations in mucous membranes, besides transitional anomalies in the liver
6
7 enzymatic activities and kidney problems (Asimiea and Sam-Wobo, 2011).
8
9 Besides, embryotoxic and fetotoxic effects have been observed, though there is
10
11 no clear evidence of teratogenic or carcinogenic activity in laboratory animals or
12
13 humans (World Health Organization, 2006; Zhang et al., 2013).
14
15
16

17
18 In light of the problems caused by hydrocarbons both for the environment
19
20 and human beings, the search for methods that contribute to the removal or
21
22 reduction of such compounds in the environment has been increased.
23
24

25
26 The methods used to clean contaminated environments are based on
27
28 chemical, physical or biological means. Due to the high cost of physical
29
30 treatments, and the fact that chemical methods leave substances that are
31
32 harmful to the local biota, the search for sustainable technologies using natural
33
34 biodegradable compounds has increased (Lin et al., 2012). The bioremediation
35
36 process, based on the use of living organisms for a possible recovery of places
37
38 contaminated with hydrocarbons, consists in the biological decomposition of
39
40 such organic compounds by microorganisms that use such pollutants as carbon
41
42 source to obtain energy, biodegrading them into carbon dioxide, water, mineral
43
44 salts and gases (Banat et al., 2010).
45
46
47
48

49
50 According to Garcia et al. (2006), biodegradation of surfactant
51
52 compounds happens when microorganisms use them as carbon and energy
53
54 source. In this process, there is, firstly, the breakdown of hydrocarbons chain,
55
56 promoting structural modification and immediate loss of amphipathicity. Then,
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the products resulting from the first degradation are converted into CO₂, water
2
3 and minerals.
4

5
6 The formation and accumulation of biosurfactants are related to a series
7
8 of parameters which, according to Mukherjee et al. (2006), need further study in
9
10 order to reach higher yield in the production of such compounds, with lower
11
12 costs. The promising future of biosurfactants depends on the use of low-cost
13
14 raw materials and optimization of the growth conditions to increase the
15
16 production of the product.
17
18
19

20
21 In this context, this work aims at evaluating the efficiency of
22
23 biosurfactants obtained during the development of *Bacillus subtilis*, *Bacillus*
24
25 *megatherium*, *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas putida* in bioremediation
26
27 of waters (different salinities) contaminated by toluene (used as single carbon
28
29 source), thus making it possible to analyze the effects of the salinity in the
30
31 studied media on the action of the surfactant compounds on hydrocarbon.
32
33
34

35 For such purpose, the saline media were classified as: low salinity
36
37 medium (LS); Bushnell-Haas medium (BH) and artificial sea water (SW). These
38
39 media were compared for equivalence of the biosurfactants levels obtained, and
40
41 consumed hydrocarbon, during the development of the studied bacteria.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Growth media

The saline media used in this study presented, or not, the addition of 3% toluene. The low salinity medium (LS, 11 mOsmol L⁻¹) was prepared in a 1:10 (v/v) ratio of Bushnell-Haas medium and distilled water. The Bushnell-Haas medium (BH, 110 mOsmol L⁻¹) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was prepared pursuant to the manufacturer's instruction. The growth medium presents the following components (g/L): Magnesium Sulfate (0.2), Calcium Chloride (0.02), Monobasic Potassium Phosphate (1.0), Dibasic Potassium Phosphate (1.0), Ammonium Nitrate (1.0), and Ferric Chloride (0.05). The artificial sea water (SW, 1100 mOsmol L⁻¹) was prepared pursuant to the adapted formulation of Bidwell & Spotte (1985), whose salts are classified into macroelements and microelements, with the composition (g L⁻¹): Calcium Chloride (27.6), Magnesium Sulfate (6.9), Magnesium Chloride (5.4), Calcium Chloride (1.4), Potassium Chloride (0.6), Sodium Bicarbonate (0.2), Potassium Bromide (0.027), Strontium Chloride (0.02), Manganese Sulfate (0.004), Sodium Phosphate (0.004) and Sodium Molybdate (0.001).

2.2 Microorganisms

Bacteria *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Bacillus megatherium* (ATCC 14581) and *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580) were studied for the

1 verification of toluene biodegradation in aqueous media. *Pseudomonas putida*
2
3 (ATCC 12633) was employed with comparative purpose. All strains were
4
5 acquired from André Tosello Foundation (Campinas - SP - Brazil) and stored
6
7 until use at -80 °C in BH media with 5% of yeast extract and 50% (v/v) glycerol
8
9 solution at pH 7.0.
10
11
12
13
14
15

16 *2.3 Bacteria growth on rotary shaker*

17
18
19

20 Pre-cultures were prepared, taking 1000 µL of the strains stored and
21
22 transferred into 15 mL of BH media with 5% of yeast extract to be incubated at
23
24 30 °C and 200 rpm in rotary shaker (New Brunswick, G 25KC model) during 24
25
26 h. 2% of the pre-culture was used to inoculate test tubes containing 20 mL of
27
28 saline media, as described on section 2.1, and used for tests performed in
29
30 shaker at 200 rpm and 30 °C for 96 h. The whole content of a test tube was
31
32 used for each sample after 48, 72 and 96 h to determine biosurfactants and
33
34 biomass concentration.
35
36
37
38
39
40
41

42 *2.4 Bacteria growth on bioreactor*

43
44
45
46

47 From the rotary shaker tests, the bacterium that showed the best
48
49 performance on biosurfactant production was selected. The essays were
50
51 performed on New Brunswick BioFlo[®]/Celligen[®] 115 bench-top bioreactor,
52
53 containing 2% of the inoculants in 1.5 L of the saline medium described on
54
55 section 2.1 and 3% of toluene. Pre-cultures were harvested under similar
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

conditions as described before. The fermentation conditions were 30°C temperature, 200 rpm stirring and 1.0 vvm aeration for 42h. Surface tension (biosurfactant production) and cell biomass quantity were assessed during the process.

2.5 Cell determination

Bacterial growth in experiments was measured by dry cell weight. It was determined by filtering 5 mL samples through pre-dried and weighted membrane filters (Millipore, 0.45 µm). After this, the membranes were dried in an oven at 100 °C for 24 h.

2.6 Biosurfactant evaluation

Samples were taken at given fermentation times and biosurfactants was determined by measuring the surface tension (ST) of culture media using the Ring method (Kim et al., 2000) employing a tensiometer model Krüss - K9-Mk1 (Hamburg, Germany) at room temperature. The biosurfactant concentration [BS] was calculated using the calibration curve reported by Rodríguez-Pazo et al. (2013): $[BS] \text{ (mg/L)} = (ST \text{ (mN/m)} - 76.984)/-8.64658$ which was obtained using surfactin at different concentrations below the critical micelle concentration (CMC) with known values of ST.

2.7 Toluene analysis by Gas Chromatography (GC)

This test was performed at the Setor Técnico de Tratamento de Resíduos Químicos e Solventes (Technical Department of Chemical Residue and Solvent Treatment), Instituto de Química, at the chromatographic analysis laboratory.

At first, the toluene extraction was performed by using 1:3 (v/v) (sample:chloroform), in which the chloroform extract (0.5 μL) was injected in an Agilent gas Chromatograph (7820A model). The toluene presence evaluation was performed in an HP-5 column (5% of Phenyl Methyl Silicone), width of 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm (Agilent Technologies). Thereafter, the conditions were: 40°C initial temperature for 1 minute and heating curve of 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to 80 $^{\circ}\text{C}$ remaining for 1 minute. Flame composition (300/30 mL min^{-1}) Synthetic air: Hydrogen; Carrier Gas: Helium at 28.516 mL min^{-1} .

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 Growth of microorganisms in rotary shaker and biosurfactant production

Preliminary experiments were conducted using a rotary shaker in order to select, among different *Bacillus* strains (namely *B. subtilis*, *B. megatherium* and *B. licheniformis*), the bacterium with higher tolerance to toluene, since this compound was used as the only carbon source. For this purpose, the selected bacteria were grown in toluene-based culture media using different salinities, or in the absence of this organic subject. Additionally, *P. putida* was also assayed for comparison, considering that this microorganism has been thoroughly studied due to its high biosurfactant production capacity (Aparna et al., 2011).

The biomass concentration of the studied microorganisms varied from 0.08 ± 0.01 to 1.32 ± 0.01 g L⁻¹, in all the growth media evaluated in this study. Results including the standard deviations are shown in Table 1 and Table 2. Using the lowest salinity medium (LS medium), the strain *B. licheniformis* showed the greatest growth in culture media elaborated in absence of toluene, reaching up to 0.82 ± 0.02 g L⁻¹ after 96 h fermentation. On the other hand, the presence of toluene was detrimental for all microorganisms, reducing considerably the results achieved. With the exception of *P. putida*, *B. subtilis* showed the greatest growth, although the cell concentration decreased to only 0.16 ± 0.02 g L⁻¹.

Regarding the use of intermediate salinity media, the use of Bushnell-Haas medium (BH medium) was positive, in general, for all microorganisms

1 under all the conditions evaluated, improving considerably the results with
2 regard to the use of LS medium. Thus, in the absence of toluene, the highest
3 growth was obtained again using *B. licheniformis*, in this case producing up to
4 $0.60 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ after only 48 h fermentation (see Table 1). However, under the
5 presence of toluene, the best result in terms of biomass growth was obtained
6 using the strain *B. megatherium* ($0.52 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ after 48 h), although this
7 value was reduced to $0.08 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ after 96 h.

17 Finally, using the media that simulated seawater (SW medium), and
18 consequently with the highest amount of salt, *B. subtilis* and *B. licheniformis*
19 strains show the best results in absence of toluene ($0.80 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ and $0.76 \pm$
20 0.01 g L^{-1} , respectively). However, these values were achieved after a longer
21 time of fermentation, 72 h, suggesting that microorganisms require an
22 adaptation period under the highest presence of salt. Regarding the use of
23 culture media formulated with toluene, *B. subtilis* showed a slightly better
24 behavior, with an average cell growth of 0.38 g L^{-1} during the whole
25 fermentation process, thus being, consequently, the most stable strain under
26 extreme conditions of salts.

42 By means of the cell growth results obtained in the experiments
43 performed using a rotary shaker, and taking in mind the scale-up to a bioreactor
44 scale, *B. subtilis* could be considered as the most appropriated microorganism
45 to be developed in culture media containing toluene, since average biomass
46 concentrations of 0.14, 0.11 and 0.38 g L^{-1} were obtained using LS, BH and SW
47 growth media, respectively (Table 2). Therefore, this strain presented the

greatest cell growth amongst all studied microorganisms in this study, with the exception of *B. megatherium*, in BH medium ($0.52 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$), and *P. putida*.

Regarding the capacity of these microorganisms to produce biosurfactants, the behavior depended on the presence of toluene considering the values of surface tensions (ST) plotted in Figure 1 and the amount of biosurfactant (in mg L^{-1}) expressed as biosurfactant equivalent compiled in Table 1 (in the absence of toluene) and Table 2 (in the presence of toluene). A substance can be considered as surfactant when is able to reduce the ST in at least 8 units (Van der Vegt et al., 1991). Thus, in the absence of toluene, the ST reductions shown in Table 1 indicate that only *B. subtilis* in LS medium was able to reduce the ST in 8.45 ± 0.49 units after 72 h ($1.32 \pm 0.06 \text{ mg L}^{-1}$) and 13.05 ± 0.07 units in SW medium after 96 h ($1.85 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$). *B. licheniformis* only reduced the ST in more than 8 units in LS medium (11.85 ± 0.35 units) after 48 h, reaching $1.72 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ of biosurfactant, meanwhile, *B. megatherium* hardly reduced the ST in only all growth media assayed in this study, producing less than 1 mg/L of biosurfactant. In spite of *B. subtilis* showed the smallest average cell growth in LS medium ($0.11 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ after 48 h and 0.24 ± 0.02 after 96 h, according to data shown in Table 1), this strain was capable of reducing the ST below the one obtained with *B. megatherium* and *B. licheniformis*. According to Desai and Banat (1997), the efficient biosurfactants have low critical micelle concentration (CMC), that is, a smaller quantity of surfactant is needed to decrease the ST, which demonstrates that the biosurfactant produced by *B. subtilis* was more efficient than the one produced by the other tested strains. Conversely, *P. putida* strain (used for comparison)

1 was the microorganism that best developed, reducing considerably the ST
2 reduction in almost all the cases considered. The highest reduction ($21.25 \pm$
3
4 1.06 units) was achieved in LS medium after 72 h, producing up to 2.80 ± 0.12
5
6 mg L^{-1} of biosurfactant. These values decreased when increasing salinity, with
7
8 16.45 ± 0.49 and 11.80 ± 0.28 units of reduction in BH and SW media,
9
10 respectively.
11
12
13
14
15

16 On the other hand, the use of toluene as a carbon source significantly
17 stimulated the production of biosurfactants in short periods of time. Thus, all
18 microorganisms tested, regardless of the degree of salinity, achieved reductions
19 in ST greater than 19 units in only 48 hours. The general conclusion is that in
20 the absence of toluene, it is stimulated the growth of the microorganism, but in
21 the presence of toluene, the metabolism shifts to the production of biosurfactant
22 rather than in the growth of microorganisms.
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 The highest value was reached again by the bacterium used as a
33 reference (*P. putida*), with a reduction of 33.59 ± 0.41 units in the BH medium,
34 which represented a biosurfactant equivalent as high as $4.23 \pm 0.05 \text{ mg L}^{-1}$.
35 However, these values of ST reduction were considerably reduced with the
36 fermentation time. Particularly it stands by what happened in the LS culture
37 medium where the ST reduction decreased from 25.85 ± 0.92 after 48 h to only
38 0.85 ± 0.92 units after 96 h of fermentation. Meanwhile, the target
39 microorganisms did not appreciate this behavior, considering that the values of
40 ST reduction remained constant throughout the studied interval of time. These
41 values are in agreement with those achieved by Haghighat et al. (2008), that
42 evaluated the ST of *B. licheniformis* and *B. subtilis* using raw oil (2%) as carbon
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 source, in rotary shaker, under the same parameters of the present study,
2
3 founding ST reductions of 30 mN/m and 29 mN/m, respectively, after 48 h of
4
5 growth. However, the raw oil employed comprised several different sources of
6
7 carbon, and, on this study, only toluene was used.
8
9

10
11 Mnif et al. (2011) claimed that, by using hydrocarbon derived from
12
13 petroleum, the tested strains, among them, *B. licheniformis* isolated from
14
15 oilfields, did not show the capacity of using toluene as carbon source. However,
16
17 Nicholson and Fathepure (2004) showed that only 0.004% of toluene was
18
19 consumed during the 7 days of experiment in a rotary shaker, while the same
20
21 concentration of benzene, ethylbenzene and xylene needed approximately 15
22
23 days in order to be metabolized. This fact indicates that toluene presents toxic
24
25 effect to the microorganisms and greater difficulty to be removed from the
26
27 environment.
28
29
30
31
32
33
34

35 *3.2 Fermentation for the production of biosurfactant on bioreactor*

36
37
38
39

40
41 Based on the previous experiments performed in rotary shaker, which
42
43 showed that the production of biosurfactant is mainly dependent on the
44
45 presence of a carbon source (toluene), since the stress provoked by its
46
47 presence stimulates the accumulation of biosurfactants, *B. subtilis* was selected
48
49 to scale up the process on a bioreactor in the presence of toluene under
50
51 different salinities. Several researches regarding bioremediation in aqueous
52
53 media containing hydrocarbon showed ST values equal or higher than 65
54
55 mN/m, that were reduced to values inferior to 35 mN/m depending on the
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 capacity of the bacteria to produce biosurfactants (Haghighat et al., 2008;
2
3
4 Nicholson and Fathepure, 2004; Xia et al., 2011).

5
6 According to Figure 2A, regarding the growth of *B. subtilis* in LS medium,
7
8 the test started with a ST of 73.5 mN/m, which remained almost constant until
9
10 12 h of growth. Then, the ST decreased simultaneously with the microorganism
11
12 growth, reaching a highest ST reduction of 22.6 units after 15 h, and a
13
14 maximum production of biosurfactant of 3.02 mg L⁻¹. The cell growth continued
15
16 until 24 h reaching a maximal cell concentration of 0.36 g L⁻¹ in spite of the
17
18 quantity of toluene present in the medium was reduced drastically after 12 h of
19
20 growth (from 45 mL to 7.43 mL). The ST was kept almost constant in the
21
22 interval 18-24 h possibly due to the biosurfactant reached the critical micelle
23
24 concentration (CMC), that is, when the micelle formation starts, the ST in the
25
26 fluid is not altered (Desai and Banat, 1997; Soberón-Chavez and Maier, 2010).
27
28 It can, thus, be said that the biosurfactant produced by *B. subtilis* reached its
29
30 CMC during the exponential stage of growth.
31
32
33
34
35
36

37
38 Recently, Vaz et al. (2012) reported that, as the cell concentration
39
40 increases, there is a higher biosurfactant production, which can be observed by
41
42 the decrease in the ST. The authors came to this conclusion after observing a
43
44 significant decrease in the ST after 4 hours of fermentation, which lasted until
45
46 24 hours, when the least value for ST was reached (30.1 mN/m). Likewise, a
47
48 significant decrease in the ST, from 71.2 mN/m to 27 mN/m had already been
49
50 observed by Xia et al. (2011) with the use of *B. subtilis*, right in the beginning of
51
52 the sampling, thus evidencing the biosurfactant production in the initial phase of
53
54 the growth.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 In the present study, it may be observed that, from 24 hours of culture,
2
3 there was a decrease in growth (from 0.36 g L⁻¹ to 0.16 g L⁻¹). Considering that
4
5 the hydrocarbon is consumed in almost 15 hours, the only alternative carbon
6
7 source found by the microorganisms might have been the produced
8
9 biosurfactant itself, which is confirmed by the increase in the STs of the
10
11 considered medium, which varied from 33.8 mN/m (12 h) to 61.3 mN/m (24 h).
12
13 According to Garcia et al. (2006), the biodegradation of surfactant compounds
14
15 occurs when microorganisms use such compounds as carbon and energy
16
17 source. Thus, after 24 hours of assay, there might have been a lack of carbon
18
19 source, thus causing the microorganisms growth to decrease.
20
21
22
23
24

25 The assays in BH medium (Figure 2B) present a similarity of results
26
27 when compared to the LS medium (Figure 2A), regarding the production and
28
29 consumption of biosurfactant, only with a higher increase in the biomass, which
30
31 reached 0.90 g L⁻¹ and smaller amount of ST reduction (18.9 units),
32
33 corresponding to a biosurfactant concentration of 2.62 mg L⁻¹. Finally, in SW
34
35 medium (Figure 2C), the ST ranged from 73.1 mN/m (initial) to 56.5 mN/m (after
36
37 15 h of growth), meaning a ST reduction of 16.6 units and a biosurfactant
38
39 concentration of 2.37 mg L⁻¹, slightly lower to those values achieved in BH
40
41 medium and particularly in LS medium (Figures 2A and 2B). The saline
42
43 concentration of the SW medium probably interfered in the biosurfactant-
44
45 hydrocarbon interaction, thus slowing the possible formation of vesicles.
46
47 Consequently, although *B. subtilis* microorganism adapted really well to the
48
49 studied growth media, the increase in salinity reduces slightly the production of
50
51 biosurfactants.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 In SW medium (Figure 2C), it was observed that the toluene volume
2
3 remained virtually constant (45 - 41.8 mL) during the 12 h of growth. However, a
4
5 toluene reduction, from 45 mL to 0.2 mL, was observed in 15 h of assay, period
6
7 where the biosurfactants were produced. These results confirm that *B. subtilis*
8
9 has been using toluene as a primary source of carbon for its development and
10
11 for the production of biosurfactant.
12
13
14

15 According to Desai and Banat (1997) and Aparna et al. (2011), the
16
17 biosurfactant may be extracellular, released to the growth media, or may be
18
19 adhered to the microorganism cell. In order to assess this statement, Pinto et al.
20
21 (2009) have studied *B. subtilis* by measuring the ST of the medium, with or
22
23 without cells, and observed that there was no significant difference regarding
24
25 the obtained ST values (58.7 and 56.7 mN/m, respectively), thus concluding
26
27 that biosurfactant production occurred by extracellular means.
28
29
30
31

32 On Figure 3A, regarding the cultures in LS medium using *B. subtilis*, the
33
34 foam formation was started to be observed from 12 h of assay, being more
35
36 visible after 24 h, and lasting until the end of the experiment (42 hours). Chen et
37
38 al. (2006) observed foam formation after 12 h of assay with *B. subtilis*. In BH
39
40 medium (Figure 3B), as well as in LS medium, there was foam formation after
41
42 12 h of assay, and at 24 h, the production considerably increased, filling the
43
44 bioreactor vat almost completely.
45
46
47
48

49 According to Winterburn and Martin (2012), the operating conditions of
50
51 the fermentor, such as aeration and stirring rate, influence the foam formation
52
53 process. Also, the foam tends to accumulate on the surface of the growth
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

medium; however, if there is enough aeration or stirring rate, it will blend back and return to the medium.

Finally, in the SW medium (Figure 3C), the foam production was lower than the one on LS and BH media. It is believed that such results are due to the high saline concentration of sea water (with 1100 mOsmol L⁻¹ of osmolality), considering that, according to Hanna et al. (2005), the presence of salt in the solution causes the electrostatic repulsive forces to decrease and allows the approximation of the polar part, thus benefiting the biosurfactant micellization vertically, like a highly flexible and endless rod, with micelle agglomerations. This rod with a higher number of biosurfactant monomers was described by Zhai et al. (2006) as vesicles.

When the required concentration for CMC is exceeded, the foam formation begins, where there is an accumulation of micelles that work as a surfactant reservoir (Chen et al., 2006). Confirming such observation, the referred authors demonstrated that, after 14 h of growth, the biosurfactant concentration produced by *B. subtilis* was of 32.5 mg L⁻¹ in the medium and of 1,79 mg L⁻¹ in the foam. . In our case, CMC was reached after approximately 18 h, and foam formation was clearly visible after being exceed this value (24 h).

Foam formation is important for the fermentation process, especially for the production of extracellular biosurfactants. The foam is generated in the bioreactor due to the presence of surfactant compounds in the growth medium, which are expressed by the microorganisms during the fermentation process (Junker, 2007). This fact could explain the behavior observed in fermentations. In all cases, biosurfactants were consumed after toluene depletion (between 12-

15 h), reaching a lowest amount of biosurfactant after 18 - 24 h (1.81 mg L^{-1} in LS medium after 24 h, 1.29 mg L^{-1} in BH medium after 24 h, and 1.69 mg L^{-1} in SW medium after 18h). However, it was observed a rebound in biosurfactant concentration, which could be attributed to the foam formation, particularly considering that the highest amount of biosurfactant (3.01 mg L^{-1}) was produced in BH medium after 39 h, regardless the biosurfactant concentration at 24 h (1.29 mg L^{-1}) was the lowest value. This could be due to the highest foam observed in the bioreactor bat using this medium.

4. CONCLUSIONS

Among the target microorganisms, *B. subtilis* showed to be most appropriate for the production of biosurfactants in the studied media (LS, BH and SW). The presence of toluene stimulated the production of biosurfactants rather than the microorganism growth. During fermentation, the probable formation of micelles (vesicles) promotes the breakdown of the hydrocarbon molecules, and the rapid consumption of toluene as a carbon source. From the results obtained *B. subtilis* can be a promising strain for the bioremediation of contaminated sites with hydrocarbons, although further studies must be conducted to optimize the process.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support by the Brazilian research funding institutions FAPESP and CNPq (151403/2011-2).

REFERENCES

1. ANP - Agência Nacional do Petróleo, 2011. Mancha de óleo teve redução de 12 Km² para 2 Km². OESP, São Paulo, 22 nov. 2011. <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,mancha-de-oleo-teve-reducao-de-12-km2-para-2-km2,801679,0.htm>, accessed in may/2012.
2. Aparna, A., Srinikethan, G., Hedge, S., 2011. Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* sp. on Biodegradation of Crude Oil. Int. Proc. Chem. Biol. Environ. Eng. 6, 1071-1075.
3. Asimiea, O.A., Sam-Wobo, S.O., 2011. The Impact of Hydrocarbon Waste from Brass Oil terminal on the Phytoplankton and Periphyton Communities of Lower Brass River, Niger Delta, Nigeria. J. Emerg. Trends Eng. Appl. Sci. 2, 729-733.
4. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J.P., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 427–444.
5. Chen, C.Y., Baker, S.C., Darton, R.C., 2006. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. J. Chem Technol. Biotechnol. 81, 1923–1931.
6. Costa, A.S., Romão, L.P.C., Araújo, B.R., Lucas, S.C.O., Maciel, S.T.A., Wisniewski Jr, A., Alexandre, M.R., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. Bioresource Technol. 105, 31–39.
7. Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. R. 61, 47–64.
8. Di Martino, C., López, N.I., Lustman, L.J.R., 2012. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. Int. Biodeter. Biodegr. 67, 15-20.

- 1 9. EPA., 2008. Water quality assessment and total maximum daily loads
2 information. Office of Water, Washington.
- 3
4
5 10. Fellenberg, G., 1980. Introdução aos problemas da poluição ambiental. EPU,
6 São Paulo.
- 7
8
9 11. Garcia, M.T., Campos, E., Dalmau, M., Illán, P., Sánchez-Leal, J., 2006.
10 Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening
11 test for anaerobic biodegradability. Biodegradation. 17, 39–46.
- 12
13
14
15 12. Haghighat, S., Akhavan, A.S., Mazaheri A.M., Pasdar, H., 2008. Ability of
16 indigenous *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in microbial enhanced oil
17 recovery. Int. J. Environ. Sci. Technol. 5, 385-390.
- 18
19
20
21 13. Hanna, K., Denoyel, R., Beurroides, I., Dubès, J.P., 2005. Solubilization of
22 pentachlorophenol in micelles and confined surfactant phases. Colloid Surface
23 A. 254, 231-239.
- 24
25
26
27 14. Janbandhu, A., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using
28 adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated
29 environment. J. Hazard. Mater. 187, 333-340.
- 30
31
32
33 15. Junker, B., 2007. Foam and its mitigation in fermentation systems. Biotechnol.
34 Progr. 23, 767–784.
- 35
36
37 16. Kim, S., Lim, E., Lee, S., Lee, J., Lee, T., 2000. Purification and
38 characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. Biotechnol. Appl.
39 Biochem. 31, 249-253.
- 40
41
42
43 17. Lin, C.W., Wu, C.H., Tang, C.T., Chang, S.H., 2012. Novel oxygen-releasing
44 immobilized cell beads for bioremediation of BTEX-contaminated water Original
45 Bioresource Technol., 124, 45-51.
- 46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 18. Mariano, A.P., Kataoka, A.P.A.G., Angelis, D.F., Bonotto, D.M., 2007.
2
3 Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a
4
5 petrol station. *Braz. J. Microbiol.* 38, 346-353.
6
- 7 19. Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S., 2011. Simultaneous hydrocarbon
8
9 biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *J.*
10
11 *Appl. Microbiol.* 111, 525–536.
12
13
- 14 20. Mukherjee, S., Das, P., Sen, R., 2006. Towards commercial production of
15
16 microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 24, 509–515.
17
- 18 21. Nicholson, C.A., Fathepure, B.Z., 2004. Biodegradation of Benzene by
19
20 Halophilic and Halotolerant Bacteria under Aerobic Conditions. *Appl. Environ.*
21
22 *Microbiol.* 70, 1222–1225.
23
24
- 25 22. OESP. O Estado de São Paulo. São Paulo, SP. 2000 a 2013. Daily. ISSN:
26
27 1516-294-X.
28
29
- 30 23. Pinto, M.H., Martins, R.G., Costa, J.A.V., 2009. Avaliação cinética da produção
31
32 de biossurfactante bacterianos. *Química Nova*, 32, 2104-2108.
33
34
- 35 24. Rodríguez-Pazo, N., Salgado, J.M., Cortés-Diéguez, S., Domínguez, J.M.,
36
37 2013. Biotechnological Production of Phenyllactic Acid and Biosurfactants from
38
39 Trimming Vine Shoot Hydrolyzates by Microbial Coculture Fermentation. *Appl.*
40
41 *Biochem. Biotechnol.*, 169, 2175 – 2188.
42
43
- 44 25. Soberón-Chávez, G., Maier, R.M., 2010. Biosurfactants: a general overview. In:
45
46 Soberón-Chávez, G. *Biosurfactants: From Genes to Applications*. Springer,
47
48 Germany, pp. 1-11.
49
- 50 26. Van der Vegt, W., Van der Mei, H.C., Noordmans, J., Busscher, H.J., 1991.
51
52 Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop
53
54 shape analysis by profile. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 766–770.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 27. Vaz, D.A., Gudiña, E.J., Alameda E.J., Teixiera, J.A., Rodrigues, L.R., 2012.
2
3 Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated
4
5 from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants.
6
7 Colloid Surface B. 89, 167– 174.
8
9
- 10 28. Winterburn, J.B., Martin, P.J., 2012. Foam mitigation and exploitation in
11
12 biosurfactant production. Biotechnol. Lett. 34, 187–195.
13
- 14 29. World Health Organization., 2006. Guidelines for drinking-water quality:
15
16 incorporating first addendum, third ed., Recommendations, Switzerland. 595p.
17
- 18 30. Xia, W.J., Dong, H.P., Yu, L., Yu, D.F., 2011. Comparative study of
19
20 biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of
21
22 petroleum reservoir. Colloid Surface A. 392, 124– 130.
23
24
- 25 31. Zhai, L., Tan, X., Li, T., Chen, Y., Huang, X., 2006. Influence of salt and
26
27 polymer on the critical vesicle concentration in aqueous mixture of
28
29 zwitterionic/anionic surfactants. Colloid Surface A. 276, 28-33.
30
31
- 32 32. Zhang, L., Zhang, C., Cheng, Z., Yao, Y., Chen, J., 2013. Biodegradation of
33
34 benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium*
35
36 *cosmeticum* byf-4. Chemosphere, 90, 1340-1347.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Caption of figures

Figure 1. Surface tension values in LS medium (A), BH medium (B), and SW medium (C) with or without toluene, using *Bacillus licheniformis* (□), *Bacillus megatherium* (○), *Bacillus subtilis* (◇) and *Pseudomonas putida* (△) as biosurfactant producers microorganisms in different times of fermentation (48, 72 and 96 h). Mean values ($n = 3$) $\pm$ standard deviations with different letters in the same column mean that they significantly differ among values of the same parameter ($P < 0.05$).

Figure 2. Determination of surface tension (◆), toluene concentration (■), biosurfactant concentration (●) and biomass (▲) in different media: LS medium (A), BH medium (B) and SW medium (C) in the presence of toluene, using *Bacillus subtilis* as biosurfactant producer microorganism during the fermentation process in bench fermentor.

Figure 3. Fermentation process showing biosurfactant production in bench fermentor using *Bacillus subtilis* in LS medium (A), BH medium (B) and SW medium (C) in the presence of toluene.

Table 1

Table 1. Microbial growth of different strains in low salinity (LS), Bushnell-Haas (BH) and artificial sea water (SW) media in the absence of toluene.

Strain	Time (h)	LS medium			BH medium			SW medium		
		Biomass (g/L)	BS (mg/L)	ST _{red}	Biomass (g/L)	BS (mg/L)	ST _{red}	Biomass (g/L)	BS (mg/L)	ST _{red}
<i>B. subtilis</i>	48	0.11±0.01 ^a	1.00±0.05	5.70±0.40	0.20±0.02 ^f	0.75±0.06	3.54±0.51	0.52±0.03 ⁱ	0.77±0.04	3.65±0.35
<i>B. subtilis</i>	72	0.24±0.01 ^c	1.32±0.06	8.45±0.49	0.28±0.01 ⁱ	0.86±0.06	4.45±0.49	0.80±0.03 ⁿ	0.86±0.06	4.45±0.49
<i>B. subtilis</i>	96	0.24±0.02 ^c	0.69±0.07	3.00±0.57	0.26±0.01 ^h	0.41±0.07	0.60±0.57	0.40±0.03 ^f	1.85±0.01	13.05±0.07
<i>B. licheniformis</i>	48	0.20±0.02 ^d	1.72±0.04	11.85±0.35	0.60±0.03 ^p	0.39±0.04	0.35±0.35	0.28±0.02 ^b	0.44±0.02	0.85±0.21
<i>B. licheniformis</i>	72	0.56±0.01 ^j	0.59±0.16	2.07±1.38	0.62±0.03 ^q	0.64±0.04	2.55±0.35	0.76±0.01 ^m	0.39±0.04	0.35±0.35
<i>B. licheniformis</i>	96	0.82±0.02 ^k	0.61±0.12	2.25±1.06	0.35±0.02 ^l	0.42±0.04	0.63±0.32	0.28±0.02 ^b	0.67±0.03	2.80±0.28
<i>B. megatherium</i>	48	0.28±0.02 ^f	0.36±0.02	0.10±0.14	0.48±0.01 ⁿ	0.99±0.04	5.55±0.35	0.20±0.02 ^a	0.65±0.06	2.65±0.49
<i>B. megatherium</i>	72	0.26±0.03 ^{ef}	0.89±0.05	4.70±0.42	0.60±0.02 ^p	0.62±0.05	2.37±0.47	0.44±0.02 ^h	0.54±0.05	1.70±0.42
<i>B. megatherium</i>	96	0.34±0.02 ^{gh}	0.54±0.06	1.65±0.49	0.32±0.01 ^k	0.64±0.06	2.59±0.54	0.32±0.03 ^d	0.53±0.07	1.60±0.57
<i>P. putida</i>	48	0.32±0.01 ^g	1.78±0.10	12.40±0.85	0.60±0.02 ^p	2.25±0.06	16.45±0.49	1.32±0.01 ^q	1.22±0.04	7.55±0.35
<i>P. putida</i>	72	0.32±0.01 ^g	2.80±0.12	21.25±1.06	1.01±0.02 ^r	1.46±0.05	9.63±0.47	0.62±0.01 ^k	1.71±0.03	11.80±0.28
<i>P. putida</i>	96	0.36±0.02 ^h	1.18±0.12	7.25±1.06	0.36±0.02 ^l	1.78±0.05	12.41±0.41	0.72±0.03 ^l	0.78±0.03	3.80±0.28

ST_{red}: surface tension reduction

Table 2

Table 2. Microbial growth of different strains in low salinity (LS), Bushnell-Haas (BH) and artificial sea water (SW) media in the presence of toluene.

Strain	Time (h)	LS medium			BH medium			SW medium		
		Biomass (g/L)	BS (mg/L)	ST _{red}	Biomass (g/L)	BS (mg/L)	ST _{red}	Biomass (g/L)	BS (mg/L)	ST _{red}
<i>B. subtilis</i>	48	0.16±0.02 ^c	3.06±0.08	23.50±0.71	0.08±0.01 ^a	2.72±0.08	20.53±0.67	0.34±0.03 ^c	2.85±0.05	21.70±0.42
<i>B. subtilis</i>	72	0.16±0.01 ^c	3.06±0.08	23.50±0.71	0.14±0.01 ^c	3.50±0.04	27.26±0.35	0.40±0.02 ^f	2.73±0.03	20.60±0.28
<i>B. subtilis</i>	96	0.11±0.01 ^a	2.93±0.06	22.35±0.49	0.10±0.01 ^b	3.52±0.06	27.49±0.55	0.40±0.02 ^f	3.05±0.03	23.40±0.28
<i>B. licheniformis</i>	48	0.11±0.02 ^a	3.19±0.07	24.60±0.57	0.46±0.03 ^m	3.18±0.07	24.53±0.60	0.28±0.02 ^b	2.63±0.04	19.75±0.35
<i>B. licheniformis</i>	72	0.12±0.03 ^{ab}	3.05±0.06	23.35±0.49	0.26±0.02 ^h	3.18±0.06	24.55±0.49	0.30±0.01 ^c	2.62±0.05	19.70±0.42
<i>B. licheniformis</i>	96	0.11±0.02 ^a	2.91±0.13	22.20±1.13	0.16±0.03 ^d	1.81±0.04	12.63±0.33	0.28±0.01 ^b	2.38±0.07	17.60±0.57
<i>B. megatherium</i>	48	0.14±0.03 ^{bc}	2.61±0.07	19.55±0.64	0.52±0.01 ^o	2.72±0.07	20.50±0.57	0.30±0.02 ^c	2.74±0.04	20.75±0.35
<i>B. megatherium</i>	72	0.12±0.03 ^{ab}	3.31±0.07	25.60±0.57	0.22±0.01 ^g	2.73±0.06	20.65±0.49	0.54±0.02 ^j	2.65±0.02	19.90±0.14
<i>B. megatherium</i>	96	0.14±0.02 ^{bc}	2.52±0.05	18.80±0.42	0.08±0.02 ^a	2.39±0.06	17.64±0.48	0.28±0.03 ^b	2.32±0.02	17.05±0.21
<i>P. putida</i>	48	0.48±0.02 ⁱ	3.33±0.11	25.85±0.92	0.35±0.03 ^l	4.23±0.05	33.59±0.41	1.02±0.01 ^p	3.29±0.02	25.45±0.21
<i>P. putida</i>	72	0.12±0.02 ^{ab}	2.10±0.14	15.15±1.20	0.30±0.03 ^j	3.09±0.05	23.70±0.42	0.42±0.01 ^g	2.85±0.05	21.70±0.42
<i>P. putida</i>	96	0.28±0.01 ^f	0.44±0.11	0.85±0.92	0.18±0.01 ^e	2.83±0.07	21.53±0.60	0.82±0.02 ^o	2.89±0.03	22.00±0.28

ST_{red}: surface tension reduction

Figure 1

Figure 1

Figure 2

Figure 2

Figure 3

Figure 3