
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE GLICEROL PARA APLICAÇÃO
DURANTE A BIODEGRADAÇÃO DE MISTURAS BIODIESEL/DIESEL EM SOLO**

JAQUELINE MATOS CRUZ

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Maio - 2017

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE GLICEROL PARA
APLICAÇÃO DURANTE A BIODEGRADAÇÃO DE MISTURAS
BIODIESEL/DIESEL EM SOLO**

JAQUELINE MATOS CRUZ

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Rio Claro - SP

Maio 2017

620.1122 Cruz, Jaqueline Matos
C957p Produção de biossurfactante a partir de glicerol para
aplicação durante a biodegradação de misturas
biodiesel/diesel em solo / Jaqueline Matos Cruz. - Rio Claro,
2017
145 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Biodegradação. 2. Bacillus subtilis. 3. Respirometria. 4.
Biocombustível. 5. Microbiologia. 6. DGGE. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE GLICEROL PARA APLICAÇÃO DURANTE A BIODEGRADAÇÃO DE MISTURAS BIODIESEL/DIESEL EM SOLO

AUTORA: JAQUELINE MATOS CRUZ

ORIENTADOR: EDERIO DINO BIDOIA

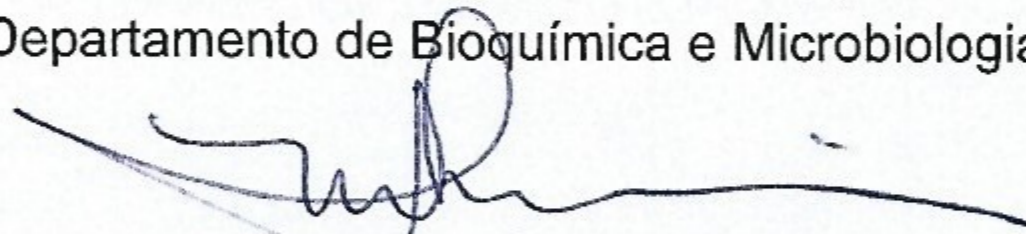
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



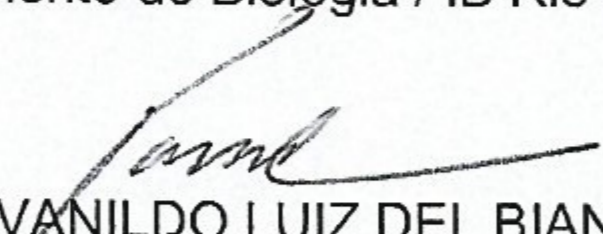
Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



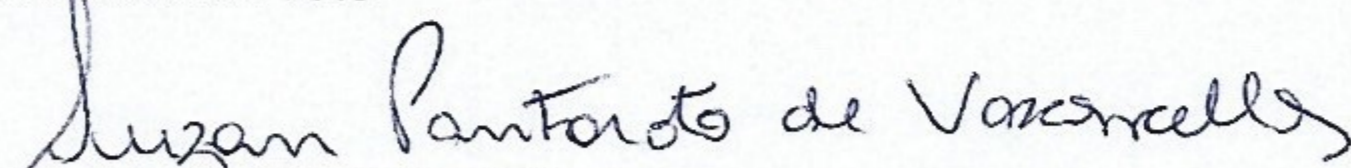
Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. VANILDO LUIZ DEL BIANCHI
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto



Profa. Dra. SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas / UNIFESP

Rio Claro, 25 de agosto de 2017

AGRADECIMENTOS

Tenho muitas pessoas a agradecer, pessoas que passaram por minha vida nesses 4 anos de doutorado, no qual eu finalizo com um amadurecimento pessoal e científico graças as pessoas citadas nesses agradecimentos.

Em primeiro, agradeço a Deus pela minha vida, pela minha saúde, por permitir concluir mais um ciclo em minha vida.

Agradeço aos meus queridos pais, Regina e José Antônio, que me dão tanto carinho, apoio e suporte para enfrentar a vida sempre olhando pelo lado positivo das situações.

Agradeço ao Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia pela confiança desde os meus primeiros trabalhos no laboratório multidisciplinar em 2010, numa caminhada da iniciação científica até o doutorado.

Agradeço a Prof. Dr. Brid Quilty, da Dublin City University, pela oportunidade de estágio que propiciaram executar algumas análises em seu laboratório e agradeço também ao Cian Hughes pela ajuda na operação e análise de RMN.

Agradeço a minha amiga Thayse Marques Passos pela acolhida em Dublin, por tornar a minha temporada em Dublin em um mundo de lembranças inesquecíveis.

Agradeço aos meus amigos de trabalho e de vida, Érica Janaína (Xena), Gabriela Mercuri (Gaby), Rubens (Rubão), Marina Turini (Marina), Renato Nallin (Bill) Guilherme Dillari (Gui), Vinícius (Vini) e a outros tantos amigos que já passaram pelo Lab. Multi e acompanharam um pouco dessa caminhada, com certeza eu aprendi muito com vocês durante esses 4 anos.

Agradeço a Lorena Tigre Lacerda, pela amizade e pela imprescindível ajuda com algumas análises ao Prof. Dr. André Rodrigues por disponibilizar o uso do laboratório, utilizando de toda a estrutura que o laboratório dispõe.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio Lambais e Prof. Dr. Fernando D. Andreote da USP-ESALQ pelo pronto atendimento em todas as vezes que foram solicitados.

Agradeço a Nádia Corroqué e a Prof. Aparecida Marin Morales por colaborar por inúmeras vezes e abrir as portas de seu laboratório sempre que solicitada.

Agradeço aos técnicos Roberto (Beto) e ao Adriano e a todos os alunos da pós-graduação do departamento que de alguma forma estiveram presentes compartilhando experiências.

Agradeço a FAPESP (processo 2013/13813-0) pela bolsa de doutorado que foi imprescindível para a realização dessa pesquisa.

Para todas as pessoas citadas aqui meu muito obrigada!

RESUMO

A biodegradação de compostos persistentes no ambiente é de extrema importância para a qualidade ambiental. Os micro-organismos do solo participam deste processo por um longo período, no qual a substância recalcitrante sofre diversas transformações químicas, até a completa mineralização do composto. O óleo diesel e grande parte dos derivados do petróleo são conhecidos pela difícil biodegradação e contaminação ambiental. Desde o ano de 2005 o biodiesel vem sendo misturado ao óleo diesel comercial em concentrações que aumentam gradativamente, com proposta de chegar ao ano de 2019 com 10 % de biodiesel adicionado ao óleo diesel comercializado em todo território nacional. O aumento da produção de biodiesel tem como co-produto a geração de glicerol. Considerando o aumento deste co-produto, este trabalho propôs a utilização do glicerol, para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*. Além disso, o estudo visou a aplicação deste biossurfactante bruto produzido para facilitar a biodegradação de misturas diesel/biodiesel pelos micro-organismos presentes naturalmente no solo. A comunidade microbiana do solo contaminado foi avaliada por método dependente (contagem de UFC) e independente de cultivo (DGGE). Para a produção de biossurfactante foi utilizado diferentes concentrações de glicerol como única fonte de carbono em meio mineral Bushnell Haas. O biossurfactante foi utilizado em solução para medir as propriedades tensoativas. Para responder às perguntas levantadas nesse estudo sobre a biodegradação de misturas diesel/biodiesel, utilizamos técnicas de respirometria, para quantificar a evolução de CO₂ no solo; plaqueamento do solo; análise da comunidade bacteriana por PCR e separação de bandas de DNA por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). As misturas de diesel/biodiesel aceleraram a produção de CO₂ nos primeiros dias de biodegradação. A comunidade microbiana aumentou ao final de 122 dias de biodegradação, mas a fitotoxicidade do solo contaminado manteve-se em altos níveis, principalmente para o solo contaminado com biodiesel. O biodiesel foi biodegradado em moléculas de pentano e metanol. Provavelmente, o metanol foi responsável pelo fitotoxicidade e pela seleção dos micro-organismos do solo. A adição de biossurfactante a 5 % não foi capaz de acelerar a produção de CO₂ em amostras de solo contaminadas com misturas diesel/biodiesel. No entanto, a aumento da concentração de biossurfactante para 8 % foi capaz de acelerar a produção de CO₂ em relação às amostras sem adição de biossurfactante. A contaminação do solo com misturas diesel/biodiesel provocou mudanças no perfil da comunidade bacteriana, em relação ao solo sem contaminação. O

biosurfactante também foi um fator que contribuiu para essa mudança do perfil da comunidade bacteriana no solo.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, respirometria, biocombustível, microbiologia, DGGE

ABSTRACT

The biodegradation process of recalcitrant compounds in the environment is important for environmental quality. The soil microorganisms are responsible for this process, which the recalcitrant substance undergoes several chemical transformations until the complete mineralization of the substance. Diesel oil and many others petroleum derivatives are known for the recalcitrance and environmental contamination. Since 2005, biodiesel has been mixed with commercial diesel fuel in concentrations that will gradually increase until 2019. The concentration at 10 % of biodiesel mixed in diesel oil will be marketed. The increase of biodiesel production has the generation of glycerol as by-products. Considering the increase of this by-product, this work proposed the use of glycerol, without any purification, for the biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. In addition, the study aimed to apply this crude biosurfactant produced to improve the biodegradation of diesel/biodiesel blends. The microbial community from contaminated soil was evaluated by cultivation-dependent and independent methods. We used different concentrations of glycerol as the only carbon source in Bushnell Haas mineral medium for biosurfactant production. The biosurfactant was used in solution to measure the surface tension and the emulsifying properties. The biodegradation of diesel/biodiesel blends was analyzed using respirometric method to quantify the CO₂ produced by micro-organisms. The microbial community was analyzed by counting of colony forming units (CFU). Also, the profile of the bacterial community was evaluated by PCR and separation of DNA bands by DGGE gel. Diesel/biodiesel blends accelerated CO₂ production in the early period of biodegradation. The microbial community increased at the end of 122 days of biodegradation. However, the phytotoxicity of contaminated soil remained at high levels, especially in the contaminated soil with biodiesel. The biodiesel was broken in pentane and methanol molecules during biodegradation. The methanol was probably responsible for the phytotoxicity and the impact on microbial growth. The biosurfactant at 5 % was not able to accelerate CO₂ production in the samples contaminated with diesel/biodiesel blends. However, the increase of the biosurfactant concentration to 8 % could accelerate the CO₂ production in relation to soil without addition of biosurfactant (B10 and B7). The contaminated soil with diesel/biodiesel blends caused changes in the bacterial community profile in relation to the soil without contamination. The addition of biosurfactant was also another factor that contributed to this change in the bacterial community profile in the soil.

Keywords: *Bacillus subtilis*, respirometry, biofuel, microbiology, DGGE

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Estrutura química da surfactina.	24
Figura 2 - Coluna cromatográfica preenchida com sílica gel 60 Å para purificação do biossurfactante.	31
Figura 3 - Monitoramento do crescimento microbiano (■), consumo de substrato (●) e produção de biossurfactante (▲) em meio de produção com 5 % de glicerol durante 96 h.	33
Figura 4 - Coloração das amostras em diferentes períodos de incubação (h) no meio de produção com 5 % de glicerol. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm.	34
Figura 5 - Curva de calibração para determinar o consumo de glicerol no meio de produção de biossurfactante.	35
Figura 6 - Crescimento da biomassa (—), produção de biossurfactante bruto (.-.-.) e consumo de substrato (----), durante 96 h.	35
Figura 7 - Biomassa de <i>B. subtilis</i> em diferentes concentrações de glicerol e no meio com glicerol e sulfato manganoso a 0,05 mM e 0,01 mM. (■). O pH das amostras também foi monitorado (■)	37
Figura 8 - Produção de biossurfactante bruto correspondente a velocidade de agitação, concentração de glicerol e concentração de sulfato manganoso. Cada eixo corresponde a uma variável e dentro de cada eixo está marcada a produção de biossurfactante bruto em mg L ⁻¹	38
Figura 9 - Cromatografia em camada delgada. A seta indica a presença de surfactina com base no cálculo do fator de retenção descrito por Nitschke (2004)	39
Figura 10 - Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do biossurfactante produzido no meio com 5 % v/v de glicerol, após purificação em coluna cromatográfica.	40
Figura 11 - Espectro de RMN de ¹ H do biossurfactante purificado em coluna cromatográfica.	41
Figura 12 - Tensão superficial do meio de produção livre de células em diferentes concentrações de glicerol e sulfato manganoso utilizando o método da gota (□). Medidas de tensão superficial do meio de produção livre de células utilizando o tensiômetro com anel de platina (■).	42
Figura 13 - Regressão linear dos valores padrões de tensão superficial da água (A) e densidade da água (B), segundo Handbook of Chemistry and Physics (WEAST, 1971).	43

Figura 14 - Tensão superficial de diferentes concentrações do biossurfactante bruto. Medidas feitas com tensiômetro com anel de platina.....44

Capítulo 2

Figura 1 - Produção mundial de etanol e biodiesel no período de 2005 a 2015.....55

Figura 2 - Respirômetro de Bartha. A = ascarita, B = câmara onde o CO₂ proveniente da biodegradação é captado, C = rolha de borracha para vedar as câmaras, D = cânula, E = local onde fica armazenada a solução de KOH, F = amostra a ser biodegradada, G = Câmara onde ocorre a produção de CO₂, H = válvula.....57

Figura 3 - CO₂ acumulado produzido pelo solo contaminado com mistura B5 (5 % biodiesel/95 % diesel) (■); B5 Bio (5 % biodiesel/95 % diesel e solução de biossurfactante a 5 % (●); B5 GL (5 % biodiesel/95 % diesel e glicerol (Δ); B5 Bio GL (5 % de biodiesel/95 % diesel, biossurfactante e glicerol (▼). Para melhor compreensão das concentrações utilizadas vide Tabela 165

Figura 4 - CO₂ acumulado produzido pelo solo contaminado com B7 (7 % biodiesel/93 % diesel) (■); B7 Bio (7 % biodiesel/93 % diesel e de solução de biossurfactante a 5 %) (●); B7 GL (B7 % biodiesel/93 % diesel e glicerol) (Δ); B7 Bio GL (7 % biodiesel/93 % diesel, biossurfactante e glicerol) (▼).66

Figura 5 - CO₂ acumulado produzido pelo solo contaminado com B10 (10% biodiesel/90 % diesel) (■); B10 Bio (10 % biodiesel/90 % diesel) e solução de biossurfactante a 5 % (●); B10 GL (10 % biodiesel/90 % diesel e glicerol) (Δ); B10 Bio GL (10 % biodiesel/90 % diesel, biossurfactante e glicerol) (▼)67

Figura 6 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) com as misturas de biodiesel/diesel e a amostra controle (sem contaminação) no tempo inicial (logo após a contaminação)70

Figura 7 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) com a mistura B5 (5 % biodiesel/95 % diesel); B5 Bio (5 % biodiesel/95 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B5 GL (5 % biodiesel/95 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (5 % de biodiesel/95 % diesel e biossurfactante e glicerol) após 90 dias de biodegradação. O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL).....71

Figura 8 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) B7 (7 % biodiesel/93 % diesel); B7 Bio (7 % biodiesel/93 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B7 GL (7 % biodiesel/93 % diesel e glicerol); B7 Bio GL (7 % de biodiesel/93 % diesel e biossurfactante e glicerol) após 90 dias de biodegradação. O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL).....72

Figura 9 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) com a mistura B10 (10 % biodiesel/90 % diesel); B10 Bio (10 % biodiesel/90 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B10 GL (10 % biodiesel/90 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (10 % de biodiesel/90 % diesel e biossurfactante e glicerol) após 90 dias de biodegradação. O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL)..... 73

Figura 10 – Média de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo contaminado com a mistura B5 (5 % biodiesel/95 % diesel); B5 Bio (5 % biodiesel/95 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B5 GL (5 % biodiesel/95 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (5 % de biodiesel/95 % diesel e biossurfactante e glicerol). O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL) 74

Figura 11 – Média de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo contaminado com a mistura B7 (7 % biodiesel/93 % diesel); B7 Bio (7 % biodiesel/93 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B7 GL (7 % biodiesel/93 % diesel e glicerol); B7 Bio GL (7 % de biodiesel/93 % diesel e biossurfactante e glicerol). O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio). 75

Figura 12 – Média de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo contaminado com a mistura B10 (10 % biodiesel/90 % diesel); B10 Bio (10 % biodiesel/90 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B10 GL (10 % biodiesel/90 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (10 % de biodiesel/90 % diesel e biossurfactante e glicerol). O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) 76

Capítulo 3

Figura 1 - Estrutura química do éster metílico de ácido graxo do tipo linoleico (a) e éster metílico de ácido graxo do tipo oleico..... 86

Figura 2 - Produção de CO ₂ acumulada durante 122 dias no solo controle (—■—), solo controle adicionado biossurfactante a 8 % (--●--), solo controle adicionado biossurfactante a 10 % (··▲··)	93
Figura 3 - Crescimento de fungos no solo controle 10 % (com adição de solução de biossurfactante a 10 %). Solo controle (lado esquerdo) e solo controle 10 % (lado direito) ...	94
Figura 4 - Produção de CO ₂ acumulada durante 122 dias no solo contaminado com biodiesel puro (—■—), solo contaminado com óleo diesel puro (—△—), solo contaminado com diesel adicionado biossurfactante a 10 % (--▲--)	95
Figura 5 - Variação da velocidade de produção de CO ₂ no solo contaminado com biodiesel (△), com diesel (●) e solo contaminado com óleo diesel adicionado solução de biossurfactante a 10 % (■).....	96
Figura 6 - Produção de CO ₂ acumulada durante 122 dias no solo contaminado com misturas, B7 (7 % biodiesel/93 % diesel) (—■—), B7 8 % (adicionado biossurfactante a 8 %) (--●--), B7 10 % (adicionado biossurfactante a 10 %) (··▲··)	97
Figura 7 - Variação da velocidade de produção de CO ₂ no solo contaminado com mistura B7 (▲), com a mistura B7 8 % (adição de solução de biossurfactante a 8 %) (■) e solo contaminado com a mistura B7 10 % (adição de solução de biossurfactante a 10 %) (●).	98
Figura 8 - Produção de CO ₂ acumulada durante 122 dias no solo contaminado com misturas, B10 (10 % biodiesel/90 % diesel) (—■—), B10 8 % (adição de solução de biossurfactante a 8 %) (--●--), B10 10 % (adição de solução de biossurfactante a 10 %) (··▲··)	99
Figura 9 - Variação da velocidade de produção de CO ₂ no solo contaminado com mistura B10 (▲), com a mistura B10 8 % (adição de solução de biossurfactante a 8 %) (■) e com a mistura B10 10 % (adição de solução de biossurfactante a 10 %) (●)	99
Figura 10 - Sementes de <i>Lactuca sativa</i> e <i>Cucumis sativus</i> exposta por 120 h em solo contaminado com biodiesel após biodegradação em BOD a 28°C	101
Figura 11 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para solos contaminados em 30 dias (■) em 60 dias (□) e em 122 dias de biodegradação (⊘). O gráfico corresponde ao número de UFC em meio <i>plate count agar</i> (PCA) e diluição 10 ⁻⁶ para contagem de UFC bacteriana.....	102
Figura 12 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para solos contaminados em 30 dias (■) em 60 dias (□) e em 122 dias de biodegradação (⊘). O gráfico corresponde ao número de UFC em meio Sabouraud e diluição 10 ⁻⁴ para contagem de UFC fúngica.....	104

Figura 13 - Alongamento da raiz de <i>C. sativus</i> em tampão de Na ₂ HPO ₄ 0,01M/ácido cítrico 0,02 M em diferentes pH (■). Condutividade de cada solução tampão em mS cm ⁻¹ (▲). A média de alongamento da raiz de <i>C. sativus</i> em água destilada foi de 2,57 cm.....	108
Figura 14 - GC/MS do biodiesel (controle), do biodiesel após 45 dias de incubação e o biodiesel adicionado cal sodada para corrigir o pH	109
Figura 15 - Curva de calibração do metanol P.A. e pico do metanol P.A. no CG/MS	110

Capítulo 4

Figura 1 - Desenho esquemático da extração do DNA total, amplificação do gene alvo e a distribuição do produto de PCR no gel desnaturante	122
Figura 2 - Primers utilizados no PCR para amplificação do DNA bacteriano	122
Figura 3 - Aparato montado com o gel de DGGE (A), as amostras aplicadas no gel (B) e a cuba de corrida do gel de DGGE (C).....	125
Figura 4 - Gel de agarose com as bandas de DNA total extraído de diferentes amostras de solo, sendo as amostras controles (réplicas 1, 2 e 3); B7 (réplicas 1, 2 e 3) B7 com solução 8 % de biossurfactante (réplicas 1, 2 e 3); B10 (réplicas 1, 2 e 3); B10 com solução de biossurfactante; a 8 % (réplicas 1, 2 e 3); B10 com solução de biossurfactante 10 % (réplicas 1, 2 e 3) e B100 puro (réplicas 1, 2 e 3). M - 1Kb - marcador de 1000 pb.....	126
Figura 5 - Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com iniciadores para os grupos bactérias totais. As amostras de solos contaminados com diferentes concentrações de biodiesel e biossurfactante são: solo controle C; mistura B7 (7 % biodiesel/97 % diesel) e com adições de 8 % biossurfactante (B7 8 %), mistura B10 (10 % biodiesel/90 % diesel) e com adição de 8 % e 10 % de biossurfactante (B10 8 %); (B10 10 %), B100 amostras com biodiesel puro. Os números 1, 2 e 3 em todas as amostras representam as réplicas de cada contaminação	127
Figura 6 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre o solo contaminado com B7e B7 8 %.....	128
Figura 7 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre o solo contaminado com B10, B10 8 % e B10 10 %.....	129
Figura 8 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre o solo contaminado com B7, B10 e B100	129
Figura 9 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de PCR-DGGE de bactéria total. Os números após a letra B indicam as concentrações de biodiesel na mistura	

diesel/biodiesel (B7, B10 e B100) e após o número a concentração de biossurfactante (8 % e 10 %). As análises foram feitas em 3 repetições realizadas em cada amostra 131

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 - Mistura de biodiesel/diesel e biossurfactante nos respirômetros.	60
Tabela 2 - Composição físico-química do solo utilizado nos respirômetros.....	60
Tabela 3 - Composição das soluções, condutividade e respectivos valores de quantidade de dióxido de carbono para construção da curva de calibração	62
Tabela 4 - Contagem de UFC do solo incubados durante 90 dias.....	69

Capítulo 3

Tabela 1 - Composição físico-química do solo utilizado nos respirômetros.....	88
Tabela 2 - Mistura de biodiesel/diesel e biossurfactante nos respirômetros.	89
Tabela 3 - Média de alongamento da raiz de <i>Cucumis sativus</i> e porcentagem de redução do alongamento da raiz no solo contaminado em relação ao controle (sem contaminação).....	101
Tabela 4 - Medida de pH (CaCl ₂ 0,01 M) do solo contaminado após 122 dias de incubação	105
Tabela 5 - Monitoramento do pH e UFC do solo contaminado com biodiesel durante a biodegradação.....	106
Tabela 6 - Alongamento da raiz de <i>C. sativus</i> , porcentagem de redução do alongamento em relação ao controle e condutividade do solo após 50 dias de incubação a 28°C.....	107
Tabela 7 - Quantificação de metanol nas amostras de biodiesel antes e após 45 dias de incubação do solo	111

Capítulo 4

Tabela 1 - Sequência de gene alvo utilizados como <i>primers</i> na PCR-1 e PCR-2.	123
Tabela 2 - Mix de reagentes para reação de amplificação usando <i>primer</i> 799F/1492R.....	124
Tabela 3 - Mix de reagentes para reação de amplificação DNA bacteriano, utilizando <i>primer</i> 968GC/1387	124

LISTA DE ABREVIATURAS

B5	Mistura de 5 % biodiesel e 95 % de óleo diesel
B7	Mistura de 7 % biodiesel e 93 % de óleo diesel
B10	Mistura de 10 % biodiesel e 90 % de óleo diesel
B100	Biodiesel puro de origem vegetal
BH	Caldo Bushnell Haas
CMC	Concentração Micelar Crítica
D100	Óleo Diesel
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GC/MS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa
KOH	Hidróxido de Potássio
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
P.A.	Para análise
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R_f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPMG	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

Sumário

CAPÍTULO 1	18
PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR <i>Bacillus subtilis</i> A PARTIR DE GLICEROL, CO-PRODUTO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	18
1 Introdução	18
2 Objetivos	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 Revisão bibliográfica.....	21
3.1 Produção de biossurfactante.....	21
3.2 Utilização de resíduo agro-industrial para produção de biossurfactantes	22
3.3 Surfactina	23
4 Material e métodos	26
4.1 Preparo do inóculo	26
4.2 Meio de produção do biossurfactante.....	26
4.3 Monitoramento da biomassa e produção do biossurfactante.....	27
4.4 Consumo de glicerol no meio de produção.....	27
4.5 Meio de produção com sulfato manganoso e diferentes concentrações de glicerol.....	28
4.6 Extração da surfactina bruta do meio.....	29
4.7 Velocidades específicas de transformação	29
4.8 Cromatografia em camada delgada	30
4.9 Purificação do biossurfactante	30
4.10 Caracterização química parcial	31
4.11 Caracterização do biossurfactante por RMN de ¹ H.....	31
4.12 Tensão superficial e concentração micelar crítica.....	32
5 Resultados e discussão	33
5.1 Crescimento do <i>B. subtilis</i> no meio de produção	33
5.2 Velocidades específicas de transformação	35
5.3 Crescimento do <i>B. subtilis</i> em diferentes concentrações de glicerol suplementados com sulfato manganoso.....	36
5.4 Cromatografia em camada delgada	39
5.5 Caracterização química parcial por FTIR	40
5.6 Caracterização química dos principais grupos orgânicos por RMN de ¹ H.	41
5.7 Tensão superficial do meio de produção livre de células.....	42
5.8 Concentração micelar crítica.....	44
6 Considerações finais.....	46
Referências	47

CAPÍTULO 2.....	51
APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO DURANTE A BIODEGRADAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL/BIODIESEL NO SOLO.....	51
1 Introdução	51
2 Objetivos	53
2.1 Objetivo geral.....	53
2.2 Objetivos específicos.....	53
3 Revisão bibliográfica.....	54
3.1 Introdução de biocombustíveis na matriz energética	54
3.2 Biorremediação de derivados do petróleo	55
3.3 Respirômetro de Bartha & Pramer	56
4 Material e métodos	59
4.1 Coleta do solo para teste de respirometria.....	59
4.2 Montagem dos respirômetros de Bartha & Pramer	59
4.3 Medidas de CO ₂ por condutividade.....	61
4.4 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)	62
4.5 Teste de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> (contato direto).....	62
4.6 Teste de fitotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> (lixiviado do solo)	63
5 Resultados e discussão	64
5.1 Respirometria do solo contaminado com misturas biodiesel/diesel.....	64
5.2 Contagem de UFC nas amostras de solo dos respirômetros.....	68
5.3 Teste de fitotoxicidade em solo (contato direto)	69
5.4 Teste de fitotoxicidade com lixiviado do solo.....	74
6 Considerações finais.....	78
Referências	79
CAPÍTULO 3	83
BIODEGRADAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL/BIODIESEL NO SOLO COM ADIÇÃO DE BIOSSURFACTANTE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	83
1 Introdução	83
2 Objetivos	84
2.1 Objetivo geral.....	84
2.2 Objetivos específicos.....	84
3 Revisão bibliográfica.....	85
3.1 Biodegradação de diesel e de misturas diesel/biodiesel.....	85
3.2 Aplicação de biossurfactante em solo contaminado por hidrocarbonetos.....	87
4 Material e métodos	88
4.1 Respirometria	88

4.2 Medidas da produção de CO ₂ por condutividade	89
4.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)	89
4.4 Medidas de pH do solo após biodegradação	90
4.5 Teste fitotoxicidade com sementes após biodegradação	90
4.6 Monitoramento do solo contaminado com biodiesel durante 50 dias	90
4.7 Análise do solo contaminado com biodiesel por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).	91
5 Resultados e discussão	93
5.1 Respirômetria do solo “in natura” (sem contaminação).....	93
5.2 Respirômetria do solo contaminado com biodiesel e diesel.....	94
5.3 Respirômetria do solo contaminado com misturas de biodiesel e diesel adicionado biossurfactante em diferentes concentrações.....	96
5.4 Teste de germinação em solo contaminado após biodegradação	100
5.5 Plaqueamento do solo após biodegradação	102
5.6 PH do solo após biodegradação.	104
5.7 Monitoramento de UFC do solo contaminado com biodiesel.....	105
5.8 Crescimento de sementes em solo contaminado com biodiesel.....	106
5.9 Análise do solo contaminado com biodiesel após 45 dias de incubação por GC/MS.....	108
6 Considerações finais.....	113
Referências	114
CAPÍTULO 4	118
COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO CONTAMINADO COM MISTURAS DIESEL/BIODIESEL APÓS BIODEGRADAÇÃO	118
1 Introdução	118
2 Objetivos	119
2.1 Objetivo geral.....	119
2.2 Objetivos específicos.....	119
3 Revisão bibliográfica.....	120
3.1 Diversidade microbiana em solo contaminado	120
3.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	121
4 Material e métodos	123
4.1 Extração do DNA total do solo após 122 dias de incubação.....	123
4.2 Amplificação do gene alvo bacteriano (16 S rRNA) por reação de polimerização em cadeia	123
4.3 Preparação do gel de DGGE	124
5 Resultados e discussão	126
5.1 Extração de DNA total	126
5.2 Análise de similaridade	126

5.3 Análise de Componentes principais (PCA).....	130
6 Considerações finais.....	133
Referências	134
Conclusão Geral	136

*PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis* A PARTIR DE GLICEROL,
CO-PRODUTO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL*

1 Introdução

A bactéria *Bacillus subtilis* produz uma substância chamada surfactina capaz de reduzir a tensão superficial, formar e estabilizar emulsões dentre outras propriedades. A surfactina é um lipopeptídeo cíclico que contém uma cadeia de ácidos graxos ligados covalentemente a uma sequência de sete aminoácidos dispostos em uma estrutura fechada. A surfactina se apresenta como uma mistura de isoformas que pode se diferenciar pelo comprimento e ramificação da cadeia de ácidos graxos ou substituições nos resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica (KOWALL et al., 1998). Essas variações dependem das linhagens de *B. subtilis* e das condições ambientais e nutricionais as quais esses micro-organismos são expostos.

Os biossurfactantes ganharam atenção devido à baixa toxicidade, biodegradabilidade, capacidade de serem produzidos em substratos renováveis e estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (NITSCHKE e PASTORE, 2005). No entanto, os biossurfactantes ainda não são economicamente competitivos com os sintéticos, pois apresentam altos custos que inviabilizam sua comercialização e produção em larga escala. Assim, o estudo de matérias-primas de baixo custo, otimização dos processos fermentativos, redução dos custos de recuperação do produto e manipulação genética de linhagens produtoras têm sido avaliadas visando aumentar a competição dos biossurfactantes aos surfactantes sintéticos (SEKHON et al., 2011; ABUSHADY et al., 2005).

Os resíduos agroindustriais são matérias-primas encontradas em grandes quantidades e baixo custo. Dentre esses resíduos, podemos citar as tortas geradas a partir da extração de óleos de sementes oleaginosas, soro de leite, melação, efluente gerado na produção de azeite de oliva e efluente provindo do processamento de mandioca e batata (NOAH et al., 2002; NITSCHKE e PASTORE, 2005; THAVASI et al., 2011; ACCORSINI et al., 2012).

A estratégia de se utilizar resíduo agroindustrial para produzir biossurfactantes poderia auxiliar na redução dos custos de produção e beneficiar a indústria que gera o resíduo, já que reduziria o custo de disposição adequada do resíduo. Diante do aumento da demanda da produção de biodiesel, o glicerol tem se destacado como uma matéria-prima de grande disponibilidade para produção de biomoléculas de interesse industrial.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de surfactina bruta por *Bacillus subtilis* a partir de meio mínimo contendo glicerol como fonte de carbono e meio suplementado com sais de manganês.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar quais as concentrações de glicerol no meio que levam a maior produção de biossurfactante bruto.
- Avaliar o consumo de glicerol por meio de métodos colorimétricos.
- Avaliar o efeito das diferentes concentrações de manganês na produção do biossurfactante bruto.
- Medir as propriedades emulsificantes e tensoativas do biossurfactante bruto produzido.
- Comparar a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H) do biossurfactante produzido, com os espectros de surfactina descritos na literatura.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Produção de biossurfactante

Os biossurfactantes são moléculas constituída de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica com propriedades tensoativas. A tensão superficial é a tensão estabelecidas entre duas fases diferentes (ex: água e ar). Já a tensão interfacial é a tensão estabelecida entre dois líquidos imiscíveis (ex: água e óleo) (BERRY et al., 2015).

Os biossurfactantes são classificados como moléculas de baixo peso molecular, os quais incluem os lipopeptídeos, glicolipídeos e proteínas e os biossurfactantes de alto peso molecular que incluem os polissacarídeos, lipopolissacarídeos proteínas e lipoproteínas (BANAT et al., 2010). Essas substâncias são produzidas por diversos micro-organismos e podem ser aplicadas em diversas atividades.

Entre os principais biossurfactantes microbianos descrito na literatura estão os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e a surfactina produzida pelo gênero *Bacillus* (MULLIGAN, 2005; BANAT et al., 2010; GUDIÑA et al., 2015; GUDIÑA et al., 2016). No entanto, outros micro-organismos do gênero *Rhodococcus*, *Candida*, *Acetobacter*, entre outros, também são descritos como produtores de biossurfactantes ou moléculas bioemulsificantes (MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes apresentam propriedades físico-químicas como diminuição da tensão superficial e interfacial, baixos valores de concentração micelar crítica (CMC) e capacidade de formar e estabilizar emulsões de óleos. A tensão superficial é a energia necessária para aumentar a área de superfície de líquido por unidade de área. Com a presença do biossurfactante, menos energia é necessária para aumentar essa área e então a tensão superficial é reduzida (MULLIGAN, 2005).

O biossurfactante produzido por *B. subtilis*, a surfactina, é considerado um dos mais poderosos biossurfactantes, devido a seu poder de diminuir a tensão superficial da água para 27 mN m^{-1} (milinewtons por metro) a qual, normalmente, apresenta tensão superficial em torno de $72,75 \text{ mN m}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. O *B. subtilis* é capaz de produzir surfactina a partir de um meio onde a fonte de carbono é solúvel em água (COOPER et al., 1981).

Quando compostos imiscíveis são colocados em uma mistura, há a formação de um limite interfacial entre elas. A porção hidrofóbica fica concentrada na superfície, enquanto que a porção hidrofílica permanece coesa na porção inferior. Neste caso, a aplicação do

biossurfactante torna a mistura um colóide, onde não é mais possível identificar as fases, devido à natureza anfipática dos biossurfactantes.

A concentração micelar crítica (CMC) é definida como a mínima concentração necessária de biossurfactante, para iniciar o processo de formação de micelas. Assim, quanto mais baixa a concentração de biossurfactante necessária para reduzir a tensão superficial, menor será o valor de CMC (MULLIGAN, 2005).

3.2 Utilização de resíduo agro-industrial para produção de biossurfactantes

Os resíduos agroindustriais estão ganhando cada vez mais visibilidade para obtenção de produtos com alto valor agregado. Esta estratégia pode reduzir o custo do produto final e destinar o resíduo agroindustrial de forma mais sustentável ou mais econômica. Nos últimos anos, muitos esforços têm sido empenhados na busca por um aproveitamento eficiente dos resíduos agroindustriais, seja ele biomassa, co-produto ou resíduo de processo (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

O sistema agrário gera enormes quantidades e variedades de biomassa e matéria-prima, tais como efluentes de laticínios com alto conteúdo de gorduras, melão com grandes quantidades de açúcar, manipueira, entre outros. Todas essas matérias-primas podem ser utilizadas na obtenção de várias biomoléculas.

A obtenção de biossurfactantes a partir de resíduo agroindustrial foi estudada por Nitschke (2004). Este estudo utilizou diversos resíduos agroindustriais e destacou a manipueira como substrato com grande potencial de produção de biossurfactantes por linhagens de *Bacillus*. Nesse mesmo contexto, Vedaraman e Venkatesh (2011) utilizaram óleo de cozinha como substrato para a produção de biossurfactante por *B. subtilis*, reduzindo o custo de produção da surfactina e abrindo mais uma via de disposição segura do óleo de cozinha usado. Thavasi et al. (2011) utilizaram *Pseudomonas aeruginosa* para produzir biossurfactante a partir de resíduos como torta de óleo de amendoim e óleo lubrificante usado. Gudiña et al. (2016) utilizaram melão de cana de açúcar e resíduo de processamento de derivados do milho para produção de ramnolipídeos. Aparna et al. (2012) destacaram a importância de resíduos agroindustriais para tornar viável a aplicação de biossurfactantes em biorremediação.

Na produção do biodiesel, o glicerol é o principal subproduto obtido após a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. Consequentemente, a produção de glicerol vem se tornando cada vez mais abundante à medida que a produção do biodiesel

aumenta. Em 2011, cerca de 260 mil toneladas de glicerol foram geradas apenas como subproduto do biodiesel, volume quase oito vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas. Na maioria das vezes este excedente é queimado para produção de energia. No entanto, seria interessante a utilização deste resíduo para originar outras moléculas de alto valor agregado. Para isso, muitos estudos estão sendo destinados à utilização do glicerol, tornando-o um produto de grande valor comercial (ROSSI et al., 2012; MEDEIROS et al., 2012; TAN et al., 2013). Os estudos com glicerol relatam o alto potencial da conversão desse resíduo em 1,3-propanodiol, que é um produto utilizado em diversas aplicações (ROSSI et al., 2012; GARLAPATI et al., 2016). O glicerol também apresenta potencial para produção de supressores de poeira e biossurfactantes (MEDEIROS et al., 2012; SOUSA et al., 2012).

Muitos micro-organismos são capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono. De Faria et al. (2011) produziram e caracterizaram a surfactina proveniente de *B. subtilis* em meio contendo glicerol como fonte de carbono. Esses autores identificaram algumas diferenças na estrutura da surfactina em relação a surfactina padrão da Sigma-Aldrich. Isso ocorre devido a variações de linhagens de *B. subtilis* e das condições ambientais e nutricionais as quais esses micro-organismos são expostos (KOWALL et al., 1998). Saimmai et al. (2012) utilizaram o glicerol purificado como fonte de carbono para a produção de biossurfactante por linhagens de *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, destacando que o *B. subtilis* obteve maior sucesso nesta produção de biossurfactante. Sousa et al. (2012) destacaram a capacidade de linhagens de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009 em reduzir a tensão superficial e formar emulsões.

A utilização de um resíduo agroindustrial pode ser uma alternativa interessante, que permitiria reduzir os custos de produção do biossurfactante, possibilitando o seu uso em larga escala, como em aplicações ambientais onde há grande demanda (BUENO et al., 2011).

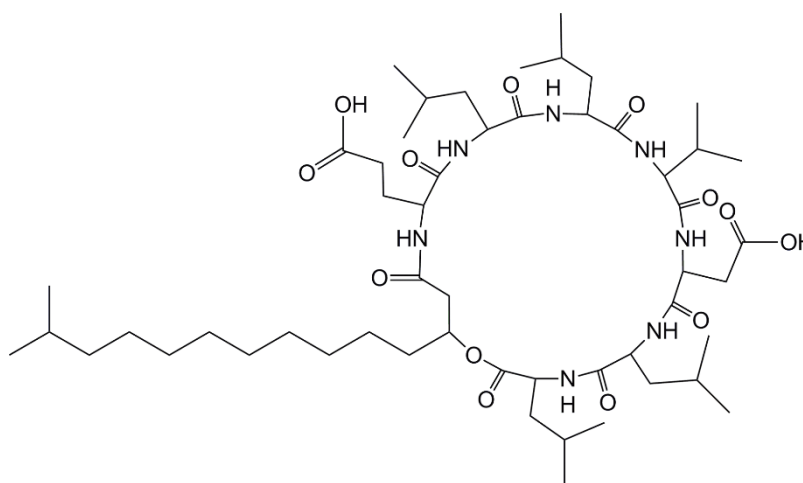
3.3 Surfactina

A surfactina produzida por linhagens de *B. subtilis* é um dos biossurfactantes mais estudados. Este biossurfactante consiste de uma longa cadeia de ácidos graxos e dois grupos funcionais (Figura 1). As linhagens de *B. subtilis* não produzem um único tipo de surfactina, pois ocorre uma diversidade natural de homólogos, o qual difere no comprimento e ramificações das cadeias de ácidos graxos (CHO et al., 2003; TANG et al., 2007). A surfactina produzida pelo gênero *Bacillus* é um lipopeptídeo cíclico que consiste de 7 unidades de aminoácidos e uma cadeia de ácido graxo de tamanho que varia entre 12 e 15 carbonos (Figura

1). Alvarez et al. (2015) indicaram o potencial de uma surfactina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* para aplicação na indústria do petróleo.

As diferentes isoformas e homólogos de surfactina exibem diferentes atividades e propriedades. A surfactina apresenta uma ótima atividade de superfície, sendo um dos biossurfactantes mais efetivos, capaz de diminuir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m⁻¹ a concentrações de 0,005 % (COOPER et al., 1981).

Figura 1- Estrutura química da surfactina.



Fonte: Liu et al. (2011).

Muitos trabalhos são direcionados para produzir e caracterizar a surfactina obtida a partir de diversas fontes de carbono (HSIEH et al., 2004; DE FARIA et al., 2011). A fonte de carbono é o fator crítico que determina a estrutura e o rendimento da produção dos biossurfactantes. No entanto, muitos outros fatores influenciam na produção de biossurfactantes, tais como a fonte de nitrogênio; as condições como pH, a temperatura e oxigenação, concentração de nutrientes como fosfato, manganês, ferro, enxofre e magnésio (LIN, 1996). Estes metais são adicionados ao meio de produção e causam efeitos significativos no metabolismo microbiano, mesmo em concentrações extremamente baixas.

A produção de surfactina em grande escala ainda é um desafio. Esta substância é vendida pela Sigma-Aldrich por um custo aproximado de 153 dólares para apenas 10 mg do produto purificado. Enquanto isso, os surfactantes químicos são vendidos a U\$ 1/lb (1libra=453,59 gramas). Para que a produção de surfactina seja viável comercialmente, o custo de produção não deve superar os U\$ 5/lb (MAKKAR et al., 2011).

Custos adicionais devido aos processos de concentração e purificação, também são fatores que tornam mais oneroso o produto final. Assim, é necessário direcionar o destino do produto final. Em processos de recuperação ambiental, não há a necessidade de purificação da molécula, sendo necessária apenas concentrar a molécula para aumentar a atividade e viabilizar a utilização.

A produção simultânea de outras moléculas bioativas pelo gênero *Bacillus* também pode viabilizar a produção de surfactina em escala industrial. Algumas espécies do gênero *Bacillus* têm a capacidade de produzir surfactina, iturina e fengicina simultaneamente (NAGÓRSKA et al., 2007; KIM et al., 2010; MORA et al., 2015). As moléculas de iturinas e fengicinas são conhecidas pelo alto poder antimicrobiano, com grande campo de aplicabilidade (NAGÓRSKA et al., 2007; KIM et al., 2010; DEY et al., 2015; MORA et al., 2015).

4 Material e métodos

4.1 Preparo do inóculo

O *B. subtilis* ATCC 6633 foi reativado de uma cultura isolada da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, IB, Rio Claro. A reativação foi feita em meio caldo nutriente (DIFCO, 1984) com 5 % de glicerol e esterilizado em autoclave. O meio esterilizado foi inoculado com *B. subtilis* e permaneceu sob agitação de 180 rpm por 24 h a 35 °C. Depois de 24 h, o meio foi centrifugado por 10 min a 1.000 \times g em centrífuga Centribio 80-2B, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução salina 0,85 %. Esta suspensão de *B. subtilis* foi utilizada como inóculo nos ensaios posteriores de produção de biossurfactante. Para padronização do inóculo, a suspensão de *B. subtilis* foi diluída até alcançar absorvância de $0,35 \times 10^{-1}$ u.a. ($\pm 1,6$ g L⁻¹ células) a 600 nm. Posteriormente, 1,0 mL do inóculo foi utilizado no meio de produção de biossurfactante. O glicerol utilizado nos ensaios foi gentilmente cedido pela empresa Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG.

4.2 Meio de produção do biossurfactante

O meio de produção de biossurfactante foi composto por 5 % de glicerol e 50,0 mL de caldo Bushnell Haas (BH). O caldo Bushnell Haas foi formulado, segundo composição descrita por Sigma-Aldrich, composto pelos seguintes sais: 0,2 g L⁻¹ de sulfato de magnésio, MgSO₄.7H₂O (Chemco P.A.); 0,02 g L⁻¹ de cloreto de cálcio, CaCl₂.2H₂O (Vetec P.A.); 1,0 g L⁻¹ de fosfato dipotássico, K₂HPO₄ (Impex P.A.); 1,0 g L⁻¹ fosfato mono potássico, KH₂PO₄ (Dinâmica P.A.); 1,0 g.L⁻¹ de nitrato de amônia, NH₄NO₃ (Vetec P.A) e 0,05 g L⁻¹ de cloreto férrico e FeCl₃.6H₂O (Dinâmica P.A). Este meio não contém fonte de carbono, de forma que o glicerol adicionado foi a única fonte de carbono. O glicerol foi esterilizado juntamente com o meio em autoclave a 121 °C durante 15 min. O meio de produção foi mantido a 35 °C e agitação de 180 rpm

4.3 Monitoramento da biomassa e produção do biossurfactante

O meio de produção foi monitorado a cada 24 h durante 4 dias para saber o período de incubação necessário para a produção do biossurfactante. Assim, o crescimento do microorganismo foi monitorado por absorvância em espectrofotômetro Hach Odyssey DR-2500 no comprimento de onda de 600 nm (BIESTA-PETERS et al., 2010). Posteriormente, foi feita uma curva de calibração, para relacionar as unidades de absorvância ao peso seco de células microbianas em g L^{-1} .

Em intervalos de 24 h foi retirada uma amostra, centrifugada a $1.000 \times g$ por 20 min e ressuspendida em 50,0 mL de solução salina 0,85 %. Uma alíquota desta suspensão foi aferida no espectrofotômetro Hach Odyssey DR-2500 e convertida em g L^{-1} , de acordo com a curva de calibração. Quando o crescimento de células alcançou uma absorvância superior a 1,0 u.a., foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, diluída em 9,0 mL de solução salina e aferida no espectrofotômetro. O pH do meio livre de células foi aferido em medidor de pH Digimed DMPH-2. O inóculo utilizado nesse monitoramento foi descrito no item 4.1. Posteriormente, o meio de produção livre de células foi submetido à extração do biossurfactante bruto por precipitação ácida.

4.4 Consumo de glicerol no meio de produção

A determinação do consumo de glicerol no meio foi realizada segundo metodologia descrita por Bondioli e Della-Bella (2005), com adaptações. Neste método colorimétrico o glicerol é oxidado com metaperiodato de sódio, produzindo formaldeído, seguido da reação Hantzsch com acetilacetona, formando o composto 3,5-diacetil-1,4-di-hidrolutidina, que apresenta absorvância máxima em 410 nm. O método necessita de várias soluções que podem ser feitas e armazenadas e outras que necessitam ser produzidas no momento da utilização. As soluções produzidas foram:

Solução estoque de ácido acético - solução aquosa de ácido acético da Exodo Científica a concentração de 1,6 M;

Solução estoque de acetato de amônio - solução de acetato de amônio a concentração de 4,0 M;

Solvente de trabalho - volumes iguais de etanol 95 % da Merck e água desionizada. Este solvente foi usado para diluir as amostras e no preparo das diluições na curva de calibração;

Solução de acetilacetona - dissolvido 200 μL de acetilacetona da Vetec P.A. em 5,0 mL de solução estoque de ácido acético e 5,0 mL de solução estoque de acetato de amônio. Preparado no momento da utilização;

Solução de periodato de sódio - foram dissolvidos 21 mg de metaperiodato de sódio em 5,0 mL de ácido acético, até completa dissolução. Posteriormente, adicionou-se 5,0 mL de solução estoque de acetato de amônio. Este reagente foi preparado no momento da utilização.

A curva de calibração do glicerol foi construída a partir de uma solução de glicerol a concentração de 0,036 mg mL^{-1} . A partir desta solução foram feitas diluições em tubos de ensaio de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5 e 2,0 mL da solução de glicerol e completados o volume com solvente de trabalho para 2,0 mL. Adicionou-se 1,2 mL da solução de periodato de sódio e agitou-se por 30 s. Depois adicionou-se 1,2 mL da solução de acetilacetona e os tubos foram colocados em banho-Maria a 70 °C por 1 min, agitando-as manualmente. Após o tempo de reação, as amostras foram resfriadas imediatamente. As amostras foram lidas a 410 nm em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2401PC.

Para determinar o consumo de glicerol no meio de produção, foi necessária a diluição da amostra na proporção de 1:1000 (10 μL da amostra para 10,0 mL de água desionizada). Desta diluição, foi retirada uma alíquota de 2,0 mL e seguiu-se o mesmo procedimento descrito para construção da curva de calibração. Posteriormente, o valor da absorvância da amostra foi relacionado à curva de calibração e considerado o fator de diluição para saber o valor real de glicerol em mg mL^{-1} .

4.5 Meio de produção com sulfato manganoso e diferentes concentrações de glicerol

O meio de produção foi composto com diferentes concentrações de glicerol e manganês. As concentrações de glicerol utilizadas no meio de produção foram 5 % v/v e 7 % v/v. O sulfato manganoso da Mallinckrodt ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foi adicionado ao meio em concentrações de 0,05 mM e 0,01 mM. O caldo Bushnell Haas forneceu os sais necessários ao crescimento microbiano. Foram colocados 50,0 mL do meio de produção em erlenmeyer de 250,0 mL em diferentes concentrações de glicerol e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min. Os erlenmeyers contendo o meio de produção previamente esterilizados foram inoculados com 1,0 mL da suspensão de células de *B. subtilis*. A preparação do inóculo foi descrito no item 4.1.

O meio de produção inoculado foi incubado durante 72 h a temperatura de 35 °C e agitação de 180 rpm em incubadora Shaker Solab. O monitoramento do crescimento do *B.*

subtilis no meio de produção e do pH foram realizados da mesma forma como descrito no item 4.3. O meio de produção livre de células foi submetido a extração da surfactina bruta por precipitação ácida como descrito abaixo no item 4.6. As concentrações de glicerol e manganês que produziram maiores quantidades de biossurfactante bruto com agitação de 180 rpm foram submetidas também a agitação de 200 rpm, visto que a agitação é responsável pela transferência de oxigênio para o meio de produção e tem influência na produção de biossurfactante (YEH et al., 2005; ABDEL-MAWGOUD et al., 2008b). Deste modo, pode-se definir as variáveis em estudo que garantem maior produção de biossurfactante bruto. Para isso, toda a metodologia e composição dos meios de produção foram conduzidas da mesma forma, como descrito neste item.

4.6 Extração da surfactina bruta do meio

O meio de produção livre de células foi acidificado com HCl a 6 M e mantido por 24 h a 4 °C±1. Após esse período, o meio foi centrifugado por 20 min a 2.000 x g (6000 rpm) e o sobrenadante descartado. O “*pellet*” obtido por centrifugação, o qual continha o biossurfactante bruto, foi ressuspenso com tampão fosfato (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) pH ±7 e colocado em cadinhos de massa conhecida. Posteriormente, foi seco em estufa a 40 °C ±1 durante, aproximadamente, 3 dias. Após seco, o biossurfactante bruto foi pesado e utilizado em solução para aferir a tensão superficial, teste de emulsificação e testes de biodegradação. O biossurfactante foi usado em solução sem nenhuma purificação.

4.7 Velocidades específicas de transformação

As velocidades específicas de crescimento da biomassa (μ_x), consumo de substrato (μ_s) e formação do produto (μ_p), neste caso do biossurfactante bruto, foram calculadas de acordo com as equações 01, 02 e 03, seguindo Borzani et al. (2001).

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad \text{equação 01}$$

$$\mu_s = \frac{1}{x} \cdot \left(- \frac{ds}{dt} \right) \quad \text{equação 02}$$

$$\mu_p = \frac{1}{x} \cdot \frac{dp}{dt} \quad \text{equação 03}$$

Onde dx/dt é a variação do crescimento microbiano no tempo “t”, ds/dt é a variação da velocidade de consumo de substrato no tempo “t” e dp/dt é a variação da velocidade de produção do produto no tempo “t”.

4.8 Cromatografia em camada delgada

A presença de surfactina foi detectada por cromatografia em camada delgada usando placas de sílica gel 60 Å com fluorescência a 254 nm. Uma amostra de 0,01 g do biossurfactante bruto e seco foi dissolvida em clorofórmio e metanol na proporção 65:15. A fase móvel consistia de uma mistura de clorofórmio, metanol e água na proporção 65:15:1 (NITSCHKE, 2004). O biossurfactante bruto diluído em clorofórmio e metanol foi aplicado à placa de cromatografia em camada delgada com auxílio de um capilar. Em um Becker, foram colocadas 20,0 mL da fase móvel e mergulhadas a base da placa de cromatografia sem que as amostras aplicadas na placa fossem submergidas pela fase móvel. Após a corrida da fase móvel, a presença da surfactina foi calculada de acordo com o R_f da surfactina padrão pela equação 04 como descrito em Nitschke e Pastore (2005). Posteriormente, as placas foram visualizadas em luz ultravioleta.

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} \quad \text{equação 04}$$

4.9 Purificação do biossurfactante

O biossurfactante bruto foi purificado em coluna cromatográfica preenchida com sílica gel Acros Organics, 0,03-0,20 mm, tamanho do poro 60 Å. A sílica gel foi ressuspenida em uma solução de clorofórmio e metanol (2:1) ambos da Sigma-Aldrich e aplicado pressão de ar para garantir um bom empacotamento da sílica (Figure 2). O biossurfactante foi dissolvido em uma solução de clorofórmio e metanol (2:1). Após dissolvido, foi adicionado no topo da coluna.

A coluna foi eluída usando diferentes soluções com aumento do grau de polaridade (DE FARIA et al., 2011). A primeira solução: clorofórmio/metanol/solução de hidróxido de amônio a 28 % em v/v na proporção 80:20:4 em v/v/v. Segunda solução: clorofórmio/metanol/solução de hidróxido de amônio a 28 % em v/v na proporção 75:25:4 em v/v/v e terceira solução de clorofórmio/metanol/solução de hidróxido de amônio a 28 % em v/v na proporção 65:35:5 v/v/v. Todos os reagentes utilizados na solução de eluição foram produtos P.A. Sigma-Aldrich.

As frações foram coletadas e a presença de biossurfactante foi detectada por placas de cromatografia em camada delgada (P. A. Merck). As placas foram coradas com solução de ninidrina e o fator de retenção (R_f) foi calculado. O biossurfactante purificado foi recuperado por rotaevaporação.

Figura 2 - Coluna cromatográfica preenchida com sílica gel 60 Å para purificação do biossurfactante.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.10 Caracterização química parcial

O espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizado para caracterização química do biossurfactante produzido. Para confecção das pastilhas de KBr foram utilizadas 150 mg de brometo de potássio (KBr P.A. – Sigma-Aldrich). Uma pequena amostra do biossurfactante obtido após a purificação em coluna foi levemente espalhado sobre a pastilha de KBr com auxílio de uma espátula. Após a aplicação da amostra na pastilha de KBr, o material foi submetido a leitura em espectrômetro Shimadzu IRPrestige-21 de 500-4000 cm^{-1} com transformada de Fourier.

4.11 Caracterização do biossurfactante por RMN de ^1H

A análise de RMN de ^1H foi realizada na Dublin City University (DCU), Dublin, Irlanda, utilizando um espectrofotômetro Bruker 600 MHz. O espectro de RMN de ^1H foi obtido do biossurfactante após purificação na coluna cromatográfica. A amostra de biossurfactante foi

diluída em 10,0 mL de clorofórmio deuterado (P.A. Sigma-Aldrich) e submetidas a análise de RMN de ^1H .

4.12 Tensão superficial e concentração micelar crítica

O meio de produção livre de células foi usado para medir a tensão superficial, por meio de Tensiômetro Krüss K6 equipado com um anel de platina de Du Noüy e também pela metodologia de contagem de gotas (NETO et al., 2009).

A tensão superficial das amostras determinadas pelo método da contagem de gotas foi calculada por meio da equação 05. A água desionizada é utilizada como padrão para determinar a tensão superficial por esse método.

$$\gamma_X = \frac{\gamma_a * d_x * n_a}{d_a * n_x} \quad \text{equação 05}$$

Onde γ_a é a tensão superficial da água desionizada e d_a é a densidade da água desionizada na temperatura na qual o experimento foi conduzido. A densidade da amostra é representada por d_x . O número de gotas contados em um período de tempo pré-determinado é representado por n_x (para a amostra) e n_a (para água).

Os dados de tensão superficial e densidade da água em determinadas temperaturas estão disponíveis no Handbook of Chemistry and Physics (WEAST, 1971). Porém, tanto a tensão superficial quanto a densidade são extremamente dependentes da temperatura. Deste modo, foi necessário fazer uma interpolação dos valores apresentados no Handbook of Chemistry and Physics com os valores de temperatura na qual o experimento foi conduzido para obter mais confiabilidade dos dados (WEAST, 1971).

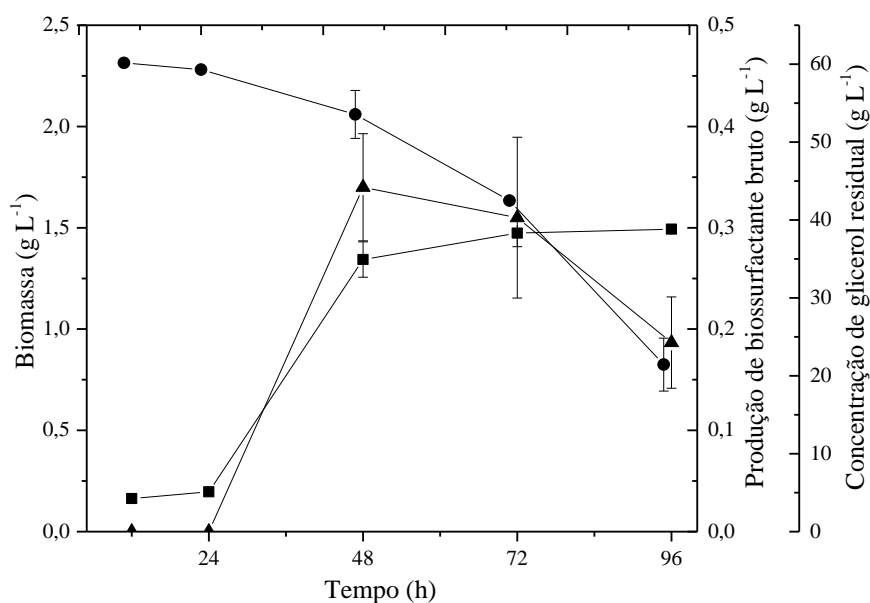
Para determinar o índice de concentração micelar crítica (CMC) o biossurfactante bruto foi macerado para obtenção de um pó. Assim, o pó foi diluído em água pH 8 para fazer a solução padrão de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. A partir da solução padrão foram feitas as concentrações de 0,50; 0,25; 0,12; 0,06 mg mL^{-1} . A tensão superficial das soluções com diferentes concentrações do biossurfactante bruto foi aferida por meio de Tensiômetro Krüss K6.

5 Resultados e discussão

5.1 Crescimento do *B. subtilis* no meio de produção

Na Figura 3 registrou-se o crescimento microbiano, o consumo de glicerol no meio e a produção de biossurfactante em intervalos de 24 h. O monitoramento do crescimento do *B. subtilis* no meio de produção a 5 % de glicerol foi importante para determinar o período de incubação que se obtém a maior produção de biossurfactante bruto, sem alterar as condições do meio de produção. Foi possível observar que o pico de crescimento celular foi de $1,49 \text{ g L}^{-1}$ em 96 h de incubação (Figura 3). O valor de pH diminuiu de 6,6 em 48 h para 5,95 em 96 h.

Figura 3 - Monitoramento do crescimento microbiano (■), consumo de substrato (●) e produção de biossurfactante (▲) em meio de produção com 5 % de glicerol durante 96 h.



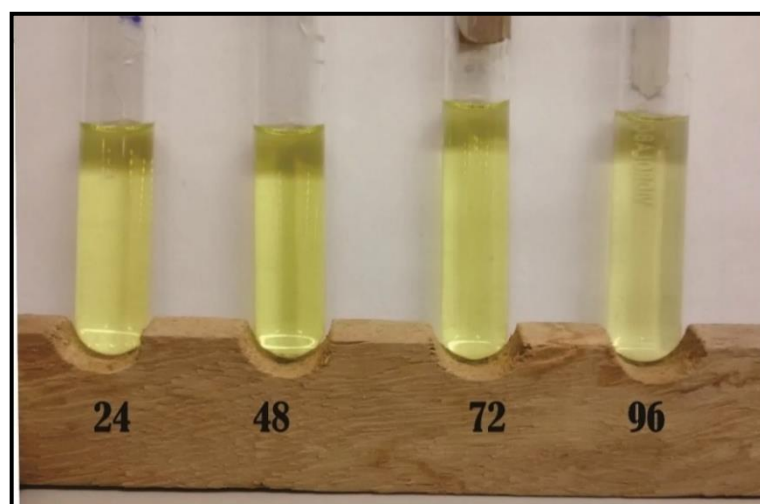
Fonte: elaborada pelo autor.

Os maiores índices de produção do biossurfactante bruto ocorreram entre 48 e 72 h como observado na Figura 3, alcançando rendimento de aproximadamente $0,34 \text{ g L}^{-1}$ de biossurfactante bruto em 48 h. Esses resultados corroboram com Sousa et al. (2012), que destacaram que o crescimento de *B. subtilis* e os maiores índices de produção de surfactina ocorreram entre 48 e 72 h de incubação. A obtenção de biossurfactante bruto em 96 h foi inferior aos tempos 48 e 72 h. Essa diminuição da quantidade de biossurfactante bruto pode ser causada pela ação das proteases que o gênero *Bacillus* produz (ANWAR e SALEEMUDIN, 1998). Nitschke (2004) também observou uma redução de 73 % na produção de biossurfactante após

72 h de fermentação, ao passo que a protease no meio de fermentação aumentou 5 vezes. Assim, Nitschke (2004) sugeriu que a protease provoca a degradação do biossurfactante produzido. Portanto, a produção de biossurfactante foi realizada em 48 h, assumindo que, após esse período, a produção de biossurfactantes tende a diminuir.

O glicerol foi consumido à medida aumentou que o crescimento microbiano, reduzindo sua concentração de $58,0 \text{ g L}^{-1}$ no tempo inicial do experimento para $21,43 \text{ g L}^{-1}$ após 96 h de incubação (Figura 3). A reação para determinar o glicerol no meio de produção de biossurfactante apresenta uma coloração amarela. A medida que a cor amarela, diminui consequentemente, a concentração de glicerol. Assim, foi possível observar visualmente a coloração amarela mais clara do meio de produção de biossurfactante em 96 h, em relação aos demais tempos (Figura 4).

Figura 4 - Coloração das amostras em diferentes períodos de incubação (h) no meio de produção com 5 % de glicerol. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm.

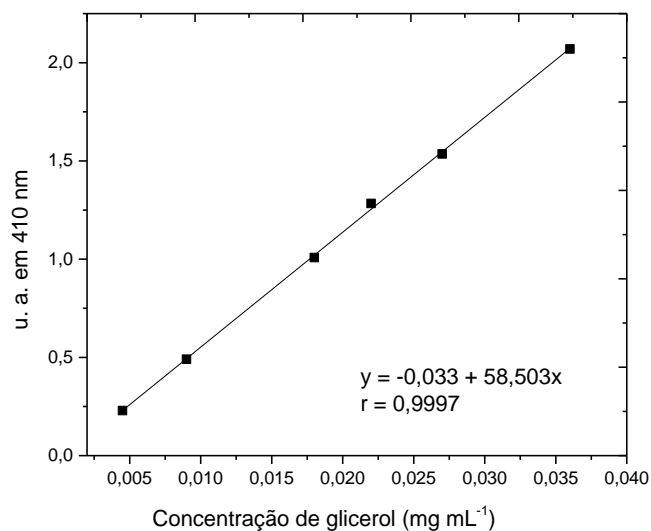


Fonte: elaborada pelo autor.

Embora o consumo de glicerol e o crescimento do *B. subtilis* tenha sido maior em 96 h (Figura 3), o meio de produção de biossurfactante apresentou uma pequena redução no valor de pH, e alterou a sua coloração inicial de transparente para rosa devido ao grande número de células mortas.

A Figura 5 representa a curva de calibração do glicerol, utilizada para o monitoramento do consumo de glicerol no meio de produção. O método é muito sensível, capaz de detectar concentrações de glicerol de $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$.

Figura 5 - Curva de calibração para determinar o consumo de glicerol no meio de produção de biossurfactante.

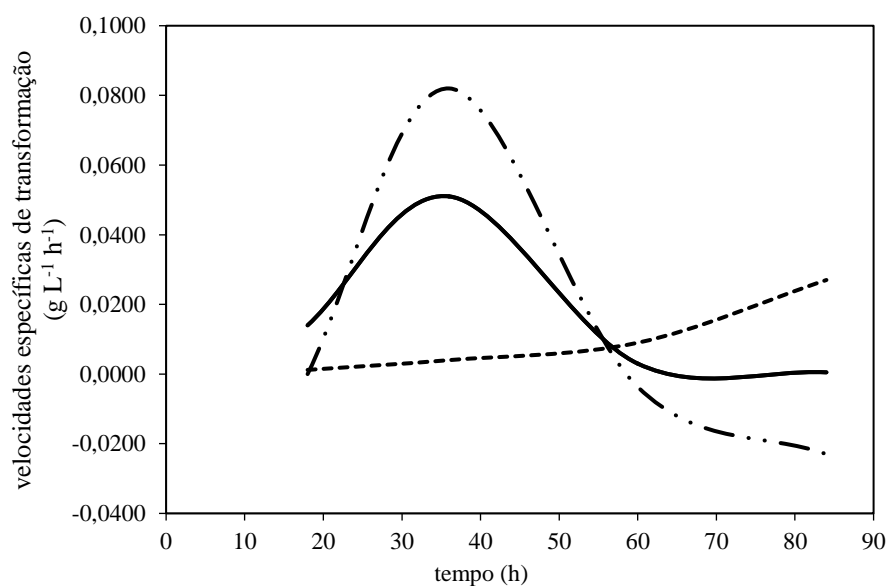


Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Velocidades específicas de transformação

As velocidades específicas estão registradas na Figura 6. Com base nas velocidades é possível sugerir que a produção de biossurfactante foi associada ao crescimento, pois o pico de crescimento microbiano e o pico de produção de biossurfactante ocorreram no mesmo instante.

Figura 6 - Crescimento da biomassa (—), produção de biossurfactante bruto (·-·-) e consumo de substrato (----), durante 96 h.



Fonte: elaborada pelo autor.

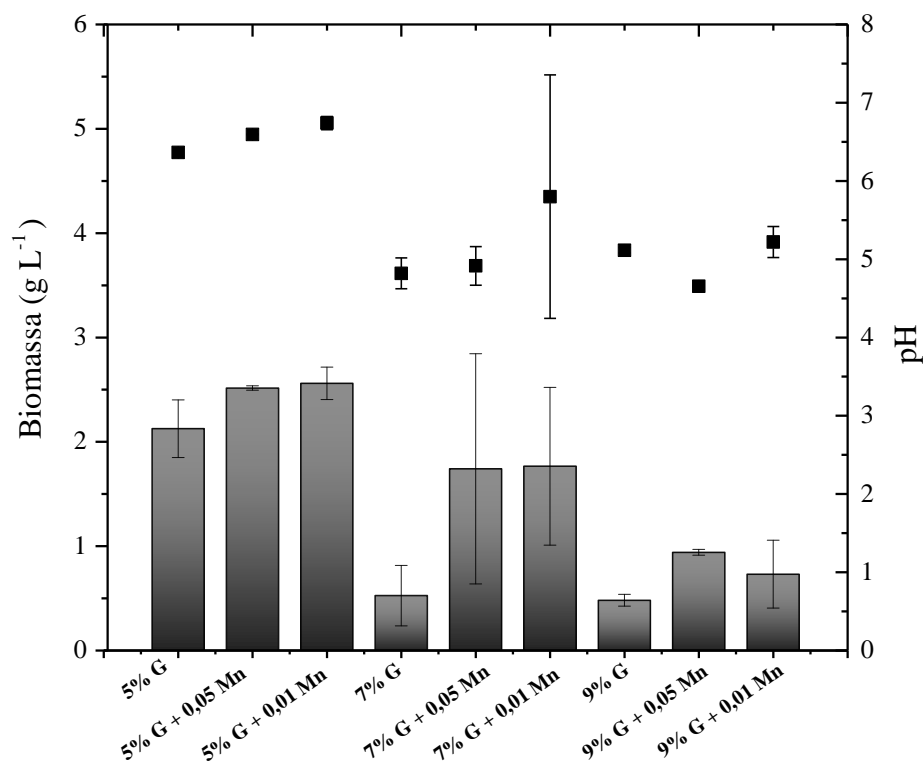
Os picos de velocidades específicas de crescimento e produção de biossurfactante também coincidiram com o final da fase exponencial de crescimento. Sousa et al. (2012) obtiveram resultados bem similares aos obtidos nesse trabalho, eles sugeriram que o biossurfactante é um metabólito primário, devido a associação de crescimento e produção.

5.3 Crescimento do *B. subtilis* em diferentes concentrações de glicerol suplementados com sulfato manganoso

O *B. subtilis* foi inoculado em meios de produção com diferentes concentrações de glicerol. A Figura 7 representa o crescimento do *B. subtilis* e o pH dos diferentes meios de produção durante 48 h de incubação. O meio com glicerol 5 % v/v alcançou 2,13 g L⁻¹ e pH 6. No meio de produção contendo 7 % e 9 % v/v de glicerol, o crescimento do *B. subtilis* foi diminuído e o pH nessas duas concentrações ficou por volta de 4 e 5. Os resultados mostraram que a adição de 0,05 mM ou 0,01 mM de sulfato manganoso no meio aumentou o crescimento microbiano em todas as concentrações de glicerol. No entanto, no meio com 7 % v/v de glicerol suplementados com sulfato manganoso houve variações de crescimento e conseqüentemente nos valores de pH.

No meio de produção contendo 5 % v/v de glicerol suplementadas com sulfato manganoso 0,05 mM e 0,01 mM alcançou crescimento microbiano de 2,52 e 2,56 g L⁻¹, respectivamente. No entanto, foi possível observar que a biomassa produzida no meio suplementado com a 0,05 mM e 0,01 mM de sulfato manganoso não apresentaram diferença considerável no crescimento do *B. subtilis*. Wei e Chu (2002) também observaram que a adição de sulfato manganoso no meio com glicose aumentou a concentração de células e, conseqüentemente, a produção de surfactina de 0,33 g L⁻¹ para 2,6 g L⁻¹.

Figura 7- Biomassa de *B. subtilis* em diferentes concentrações de glicerol e no meio com glicerol e sulfato manganoso a 0,05 mM e 0,01 mM. (■). O pH do meio de produção foi monitorado (■).



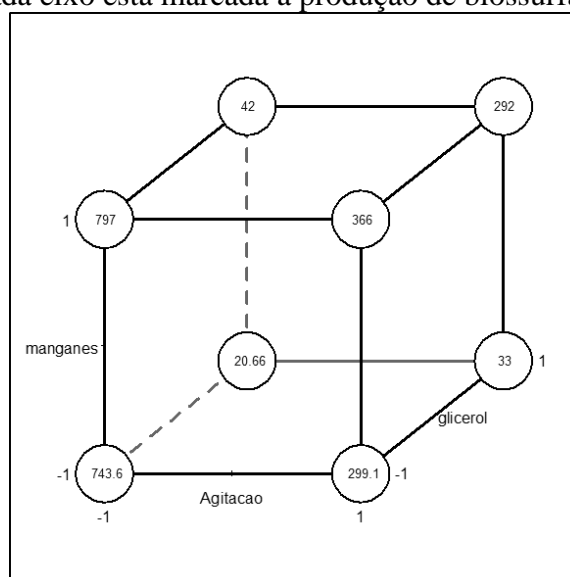
Fonte: elaborada pelo autor.

No meio de produção com 9 % de glicerol não houve produção de biossurfactante. Esta concentração não permitiu o alto crescimento dos micro-organismos no meio e, conseqüentemente, influenciou negativamente a produção de biossurfactante. Shemesh e Chai, (2013) mostraram que altas concentrações de glicerol estimularam a esporulação das células de *B. subtilis*. Essa esporulação pode ser mais intensa quando associadas glicerol com altas concentrações de manganês no meio. Assim, o meio com 9 % de glicerol pode ter favorecido a esporulação das células e, por isso, não houve produção de biossurfactante.

A produção de biossurfactante bruto nas concentrações de 5 % e 7 % v/v foram de $\pm 165 \text{ mg L}^{-1}$ e $\pm 27 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A adição de sulfato manganoso no meio com 5 % v/v e 7 % v/v aumentou a produção de biossurfactante bruto seco. Na concentração de 5 % v/v suplementado com 0,01 mM de sulfato manganoso foi recuperado 743 mg L^{-1} de biossurfactante bruto e o meio com $0,05 \text{ mM}^{-1}$ de sulfato manganoso produziu 797 mg L^{-1} , a maior quantidade de biossurfactante bruto obtida no experimento. Sousa et al. (2012), obtiveram uma produção entre 441,06 e $267,56 \text{ mg L}^{-1}$ para duas diferentes linhagens de *B. subtilis*, utilizando como fonte de carbono o glicerol.

O meio de produção com 5 % e 7 % de glicerol produziram as maiores quantidades de biossurfactante bruto quando suplementados com 0,01 mM e 0,05 mM de sulfato manganoso. Assim, essas concentrações foram submetidas a agitação de 200 rpm, para definir também a velocidade de agitação que proporcionaria maior produção de biossurfactante. Os resultados deste ensaio permitiram uma comparação entre a concentração de glicerol; a concentração de manganês e a agitação que proporcionou maior produção de biossurfactante bruto como observado na Figura 8. O cubo projetado a frente corresponde a concentração de glicerol de 5 % e o cubo projetado atrás corresponde a concentração de 7 % de glicerol. A base do cubo corresponde a concentração de sulfato manganoso 0,01 mM e o topo do cubo corresponde ao sulfato manganoso 0,05 mM. Sabendo dessas informações, podemos observar que a concentração de 5 % de glicerol, 180 rpm de agitação e 0,05 mM de sulfato manganoso alcançou uma produção de 797 mg L⁻¹ de biossurfactante bruto. Enquanto que a pior condição para produção do biossurfactante bruto foi 7 % de glicerol, 180 rpm e 0,01 mM de sulfato manganoso, o qual produziu apenas 20 mg L⁻¹ de biossurfactante bruto. A concentração de 5 % de glicerol produziu mais biossurfactante bruto em todas as condições, quando comparado com a concentração de 7 % de glicerol.

Figura 8 - Produção de biossurfactante bruto correspondente a velocidade de agitação, concentração de glicerol e concentração de sulfato manganoso. Cada eixo corresponde a uma variável e dentro de cada eixo está marcada a produção de biossurfactante bruto em mg L⁻¹.



Fonte: elaborada pelo autor.

A adição de 0,05 mM de sulfato manganoso no meio de produção aumentou a produção de biossurfactante bruto em relação ao meio de produção com apenas 0,01 mM de sulfato manganoso. O manganês tem uma função importante na produção de surfactina, pois ele

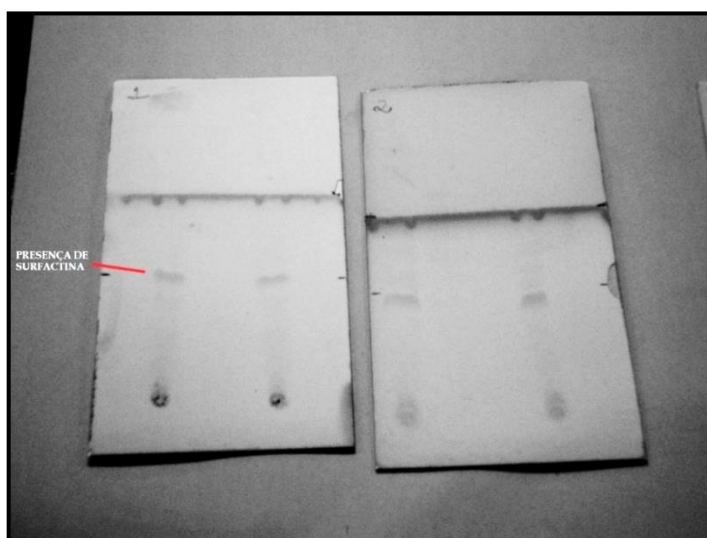
melhora o metabolismo de nitrogênio, que por sua vez é relacionado a síntese de aminoácidos livres que são necessários para produção da porção hidrofílica da surfactina (HUANG et al., 2015; GUDIÑA et al., 2015).

O oxigênio dissolvido no meio fornecido pela agitação teve efeito na produção do biosurfactante bruto. A vigorosa agitação em 200 rpm reduziu a produção do biosurfactante bruto. Yeh et al. (2005) também observaram a redução na produção de surfactina quando o meio foi submetido a vigorosa agitação de 250 rpm.

5.4 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada com indicador UV₂₅₄ permitiu visualizar a presença de surfactina no biosurfactante bruto como indicado na Figura 9. O trabalho utilizou dados da literatura que relatam o valor do fator de retenção (R_f) da surfactina próximo de 0,57 (NITSCHKE, 2004). Assim, o R_f foi determinado imediatamente após a corrida do solvente na placa de cromatografia de camada delgada e visualização das manchas em luz ultravioleta. O R_f calculado foi de 0,55, o que corrobora com estudos da literatura para a surfactina (CHO et al., 2003; NITSCHKE, 2004).

Figura 9 – Cromatografia em camada delgada. A seta indica a presença de surfactina com base no cálculo do fator de retenção descrito por Nitschke (2004).

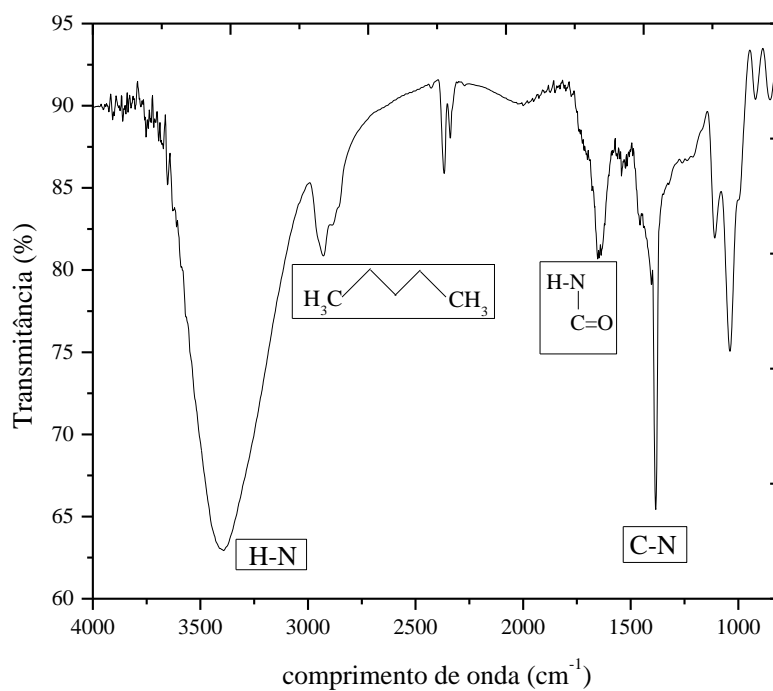


Fonte: elaborada pelo autor.

5.5 Caracterização química parcial por FTIR

O espectro de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do biossurfactante produzido no meio com 5 % v/v de glicerol está registrado na Figura 10. A banda na região de 1650 cm^{-1} é característica de grupos peptídicos e foi observada no espectro. Essa região pertence a vibração do estiramento C=O da região amida I dos grupos peptídicos. A banda observada em 3398 cm^{-1} é típica de compostos contendo estiramento de N-H no peptídeo (SHAO et al., 2015). A banda com pico em 1109 cm^{-1} é provavelmente devido a vibrações do C-O-C na ligação éster (DAS et al., 2008). As bandas nas regiões de 2933 cm^{-1} e 1382 cm^{-1} são resultantes do estiramento da ligação C-H, as quais indicam a presença de uma cadeia alifática (DE FARIA et al., 2011).

Figura 10 - Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier do biossurfactante produzido no meio com 5 % v/v de glicerol, após purificação em coluna cromatográfica.



Fonte: elaborada pelo autor.

As bandas indicadas no espectro são características da presença da surfactina. A presença dessas bandas é descrita na literatura em trabalhos de caracterização da surfactina (DAS et al., 2008; DE FARIA et al., 2011; SHAO et al., 2015). O padrão de bandas observado na Figura 10, confirmou a similaridade entre a surfactina produzida neste experimento e a surfactina padrão produzida pela Sigma Chemicals (DE FARIA et al., 2011).

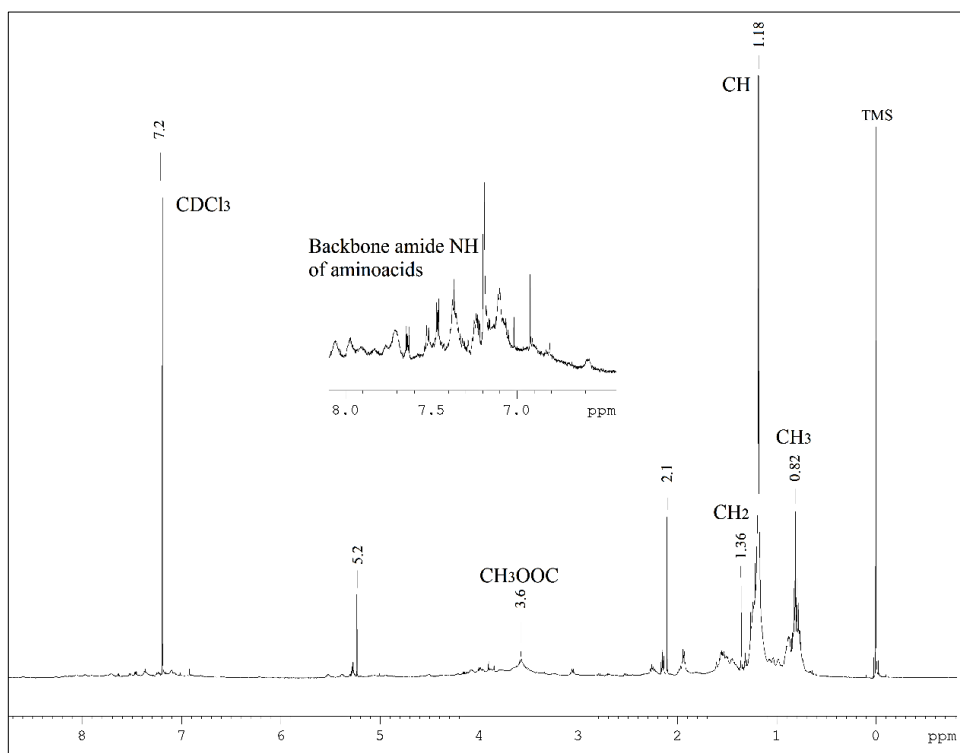
5.6 Caracterização química dos principais grupos orgânicos por RMN de ^1H .

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H) está apresentado na Figura 11. Os picos anotados no espectro de RMN de ^1H mostraram similaridade entre os espectros de surfactina descritos em outros estudos (PEREIRA et al., 2013; DE FARIA et al., 2011; LIU et al., 2009; MAKKAR e CAMEOTRA, 1999; WEI e CHU, 1998).

O pico a $\delta = 7,2$ ppm é típico do solvente clorofórmio D usado para diluir a amostra. Sendo o δ definido como o deslocamento químico (definido em inglês como “*chemical shift*”) que é expresso em ppm (GONSALVES e MELO, 2007).

A presença de grupos amidas NH foram detectados pelos pequenos picos na região de $\delta = 7,7$ a 7,0 ppm. Picos com $\delta = 5,3$ indicaram a H_α de aminoácidos, no qual é formado a porção lipofílica do biosurfactante. Os picos a $\delta = 2,18$ -0,88 ppm confirmaram a presença de uma longa cadeia alifática, que compõe a porção hidrofóbica do biosurfactante. O próton metílico (CH_3) foi observado a $\delta = 3,57$ ppm. A presença de regiões distintas no espectro permitiu sugerir que no extrato bruto obtido estava presente a molécula de surfactina (PEREIRA et al., 2013; DE FARIA et al., 2011; LIU et al., 2009; MAKKAR e CAMEOTRA, 1999; WEI e CHU, 1998).

Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H do biosurfactante purificado em coluna cromatográfica.

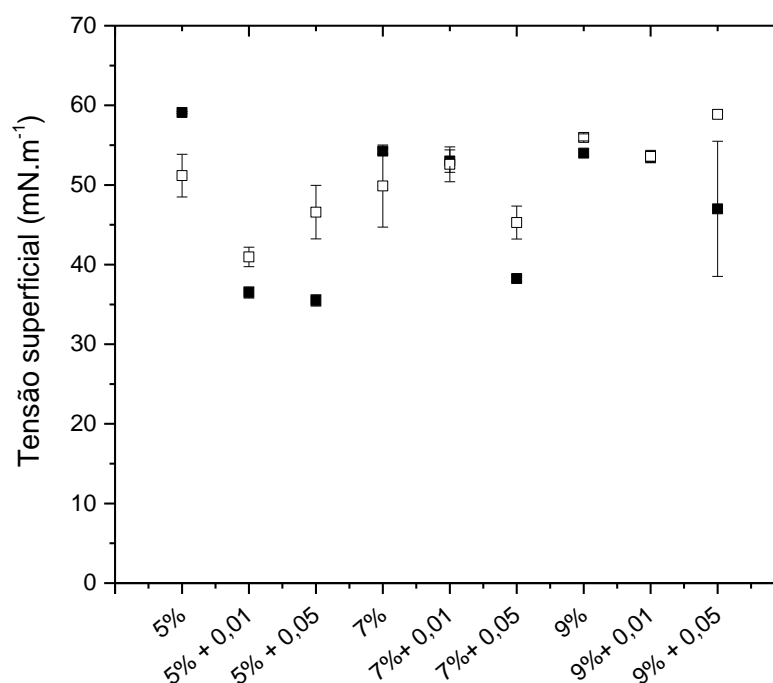


Fonte: elaborada pelo autor.

5.7 Tensão superficial do meio de produção livre de células

Os valores de tensão superficial do meio livre de células foram aferidos utilizando duas metodologias diferentes como apresentado na Figura 12. Assim, foram utilizados a metodologia de contagem de gota e para confirmar os resultados foi utilizado o tensiômetro de Krüss com anel de platina.

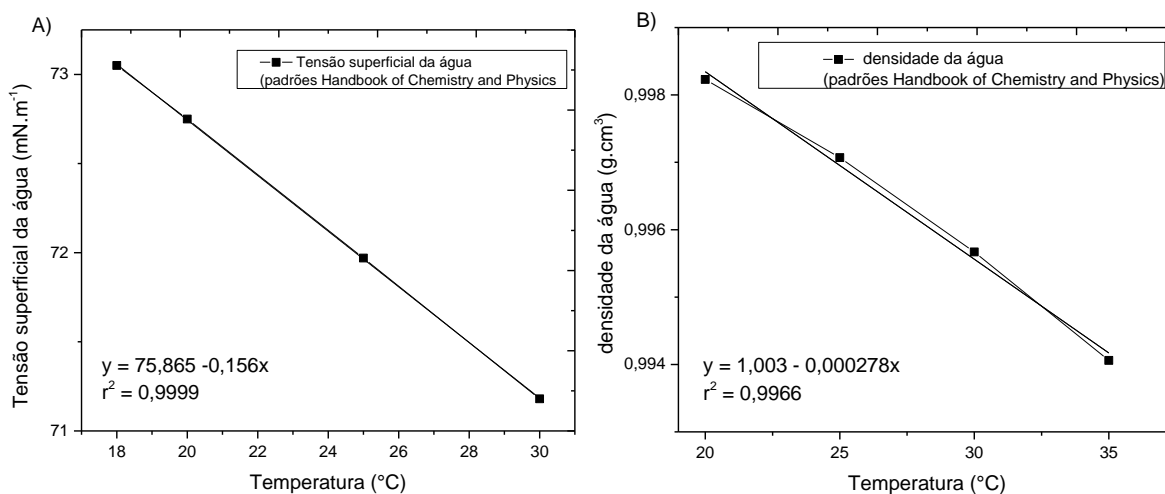
Figura 12 - Tensão superficial do meio de produção livre de células em diferentes concentrações de glicerol e sulfato manganoso, utilizando o método da gota (\square). Medidas de tensão superficial do meio de produção livre de células, utilizando o tensiômetro com anel de platina (\blacksquare).



Fonte: elaborada pelo autor.

Os valores padrões de tensão superficial e densidade da água estão representados na Figura 13A e 13B, respectivamente. Por meio da interpolação desses valores pré-determinados no Handbook of Chemistry and Physics (WEAST, 1971) foi possível calcular, com relativa precisão, os valores de tensão superficial e densidade da água na temperatura em que o experimento foi conduzido, utilizando o método de contagem de gotas.

Figura 13 - Regressão linear dos valores padrões de tensão superficial da água (A) e densidade da água (B), segundo Handbook of Chemistry and Physics (WEAST, 1971).



Fonte: elaborada pelo autor.

A tensão superficial do meio de produção livre de células representados na Figura 12 permitiu observar que nos meios de produção onde houve crescimento microbiano, a tensão superficial foi reduzida. De modo geral, as duas metodologias utilizadas para aferir a tensão superficial mostraram que o meio de produção com 5 % de glicerol e adição de sulfato manganoso a 0,01 mM apresentou o menor valor de tensão superficial nas duas metodologias, 40 mN m⁻¹ pelo método da gota e 36,5 mN m⁻¹ pelo tensiômetro.

A pequena concentração de sulfato manganoso no meio de produção permitiu um maior crescimento microbiano. E assim, foi possível sugerir que o maior crescimento de células produz maiores quantidades do biossurfactante e, portanto, a tensão superficial foi reduzida. Vale destacar que o pH tem grande influência sobre a solubilidade da surfactina e, conseqüente, na redução da tensão superficial. A surfactina precipita em pH ácidos sem alterar sua estrutura química, porém altera a tensão superficial por não estar solúvel no meio (BARROS et al., 2008). Assim, a tensão superficial do meio com 7 % de glicerol, pode ter sido alterada devido ao pH próximo de 5, aliado à concentração de biossurfactante no meio. No meio com 7 % de glicerol e adição de sulfato manganoso a 0,05 mM foram registrados valores de tensão superficial de 45 mN m⁻¹ e 38 mN m⁻¹, pelo método da gota e do tensiômetro, respectivamente. O meio com 9 % de glicerol apresentou os maiores valores de tensão superficial nas duas metodologias utilizadas.

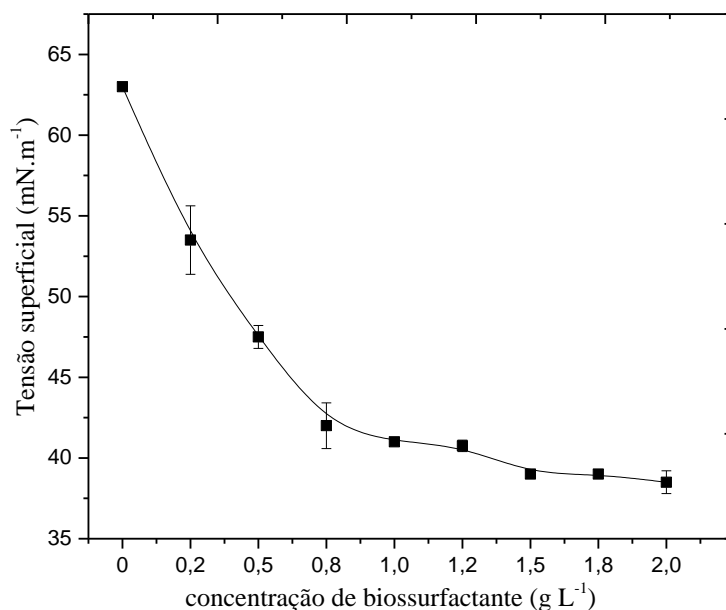
Com base nos resultados obtidos pela metodologia de contagem de gotas e a metodologia utilizando o tensiômetro podemos verificar que os resultados seguiram o mesmo padrão, sendo o menor valor de tensão superficial no meio de produção com 5 % de glicerol suplementado

com sulfato manganoso a 0,01 mM, seguido pelo meio com 7 % de glicerol suplementado com 0,05 mM de sulfato manganoso. Assim, na ausência de um tensiômetro, é possível utilizar o método da gota para ao menos mensurar a redução da tensão superficial no meio de produção de biossurfactante, a qual é uma característica muito importante para estudos de produção de biossurfactante.

5.8 Concentração micelar crítica

Na Figura 14 foi representada a tensão superficial de diferentes concentrações do biossurfactante bruto. A concentração de biossurfactante bruto de 0,25 g L⁻¹ foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $\pm 72,27$ mN m⁻¹ a 23 °C para 60,57 mN m⁻¹. A menor valor de tensão superficial foi 39 mN m⁻¹, em solução de biossurfactante bruto a 1,50 g L⁻¹.

Figura 14 - Tensão superficial de diferentes concentrações do biossurfactante bruto. Medidas feitas em tensiômetro com anel de platina.



Fonte: elaborada pelo autor.

A redução da tensão superficial e dos valores de CMC encontrados por Abdel-Mawgoud et al. (2008a) foram 36 mN m⁻¹ e 15,3 mg L⁻¹, respectivamente. Esses autores sugeriram que a variação dos valores de CMC dependem da pureza da surfactina. Assim o alto valor de CMC determinado nesse estudo pode ser devido a utilização do biossurfactante bruto, sem purificação. Além disso, Liu et al. (2011) sugeriram que o número de carbonos na cadeia de

ácidos graxos, que corresponde a porção hidrofóbica do biossurfactante, tem influência direta no CMC e na solubilidade da surfactina.

Os biossurfactantes tornam-se inviáveis em aplicações ambientais devido ao seu custo, em maior parte, relacionados com o meio de produção e os custos de purificação, que ao final do processo obtém um baixo rendimento. No entanto, os resultados deste trabalho quanto ao índice de emulsificação e a diminuição da tensão superficial permitiu sugerir o uso do biossurfactante bruto em aplicações ambientais. A utilização do biossurfactante sem purificação reduziria ainda mais o custo de produção bem como a diminuição do impacto deste composto no ambiente, visto que alguns micro-organismos são sensíveis a presença de biossurfactantes, os quais também podem apresentar propriedades antimicrobianas. Esta ação antimicrobiana pode ser muito impactante se o biossurfactante estiver puro e, conseqüentemente, mais concentrado.

Embora muitos esforços tenham sido focados no desenvolvimento de linhagens altamente eficientes na produção de biossurfactante, o baixo custo da fonte de carbono é imprescindível para a redução dos custos de produção. Desse ponto de vista, o glicerol, tende a ser uma fonte de carbono de baixo custo, à medida que maior produção de biodiesel for necessária. No presente trabalho, o glicerol foi uma fonte de carbono adequada para a produção de biossurfactante em escala laboratorial.

6 Considerações finais

A concentração de 5 % de glicerol no meio proporcionou melhor produção de biossurfactante.

As concentrações de 7 % e 9 % inibiram o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a produção de biossurfactante.

A adição de 0,05 e 0,01 mM de sulfato manganoso no meio de produção com 5 % de glicerol aumentou a produção do biossurfactante bruto em relação a amostra sem adição do sulfato manganoso.

O meio com concentração de glicerol a 5 % suplementados com 0,05 mM de sulfato manganoso e agitação de 180 rpm proporcionaram as melhores condições para a produção de biossurfactante.

O biossurfactante bruto foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio.

Os espectros de FTIR e RMN indicaram a presença da surfactina no extrato bruto produzido.

Referências

- ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 150, p. 289-303, 2008a.
- ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 150, p. 305-325, 2008b.
- ABUSHADY, H. M.; BASHANDY, A. S.; AZIZ, N. H.; IBRAHIM, H. M. M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. *International Journal of Agriculture & Biology*, v. 7, p. 337-344, 2005.
- ACCORSINI, F. R.; MUTTON, M. J. R.; LEMOS, E. G. M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 116-125, 2012.
- ALVAREZ, V. M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J.; M.; DE SOUZA, P. M.; DE ARAÚJO, L. V. BARROS, T. G.; DE SOUZA, R. O. M. A.; FREIRE, D. M. G.; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 14–21, 2015.
- ANWAR, A.; SALEEMUDIN, M. Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 175-183, 1998.
- 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.
- 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, p. 427–444, 2010.
- BARROS, F. F. C.; de QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia do Alimento*, v. 28, p. 979-985, 2008.
- BERRY, J. D.; NEESON, M. J.; DAGASTINE, R. R.; CHAN, D. Y. C.; TABOR, R. F. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 454, p. 226–237, 2015.
- BIESTA-PETERS, E. G.; REIJ, M. W.; JOOSTEN, H.; GORRIS, L. G. M.; ZWIETERING, M. H. Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 76, p. 1399-1405, 2010.
- BONDIOLI, P.; DELLA-BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 107, p. 153-157, 2005.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotechnologia industrial*. 1º edição. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001, 539 p.

- BUENO, G. F.; AQUINO, P. L. M.; NASCIMENTO, V. M.; DEL BIANCHI, V. L. Evaluation of the pre-inoculum utilization in biosurfactant production by solid-state fermentation. *Holos Environment (Online)*, v. 11, p. 88-88, 2011.
- CHO, S. J.; HONG, S. Y.; KIM, J. Y.; PARK, S. R.; Kim, M. K.; Lim, W. J.; Shin, E. C.; Kim, E. J. Cho, Y. U.; Yun, H. D. Endophytic *Bacillus* sp. CY22 from a Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum*) produces surfactin isoforms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p. 859–865, 2003.
- COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, p. 408-412, 1981.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 675–1684, 2008.
- DE FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; BARBOSA, G. N. de O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TÓTOLA, M. R.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1951-1957, 2011.
- DEY, G.; BHARTI, R.; DHANARAJAN, G.; DAS, S.; DEY, K. K.; KUMAR, B. N. P.; SEN, R.; MANDAL, M. Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3 β and FoxO3a signaling and triggers apoptosis in breast cancer. *Nature Publishing Group*, v. 5, p. 1–14, 2015.
- DIFCO. *Difco Manual*. Difco Laboratories, Detroit, 1984.
- GARLAPATI, V. K.; SHANKAR, U.; BUDHIRAJA, A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*, v. 9, p. 9–14, 2016.
- GONSALVES, A. R.; MELO, T. P. *Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear*. Coimbra: Coimbra University Press, 2007, 208 p.
- GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-7, 2015.
- GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; DE FREITAS, V.; AZEVEDO, Z.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology*, v. 212, p. 144–150, 2016.
- HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, v. 49, p. 186-91, 2004.
- HUANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LU, L. The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 29, p. 381–389, 2015.
- KIM, P.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 138–145, 2010.

- KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P. E.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 204, p. 1-8, 1998.
- LIN, S. Biosurfactants: Recent advances. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 66, p. 109-120, 1996.
- LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Indian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 1144-1151, 2009.
- LIU, Y.; KOH, C. M. J.; JI, L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3927-33, 2011.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 °C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 2, p. 367-372, 1999.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 428-434, 2002.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, v. 1, 2011.
- MEDEIROS, M. A.; LEITE, C. M. M.; LAGO, R. M. Use of glycerol by-product of biodiesel to produce an efficient dust suppressant. *Chemical Engineering Journal*, v. 180, p. 364-369, 2012.
- MORA, I.; CABREFIGA, J.; MONTESINOS, E. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS ONE*, v. 10, p. 1-21, 2015.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-98, 2005.
- NAGÓRSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKI, M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, v. 54, p. 495-508, 2007.
- NETO, E. T.; MALTA, M. M.; SANTOS, R. G. Medidas de tensão superficial pelo método de contagem de gotas: descrição do método e experimentos com tensoativos não-iônicos etoxilados. *Química Nova*, v. 32, p. 223-227, 2009.
- NITSCHKE, M. *Produção e caracterização de biosurfatante de Bacillus subtilis utilizando manipueira como substrato*. 2004. 99 folhas. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, São Paulo. 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, 2005.
- NOAH, K. S.; FOX, S. L.; BRUHN, D. F.; THOMPSON, D. N.; BALA, G. A. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 803-813, 2002.

- PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, v. 111, p. 259-268, 2013.
- ROSSI, D. M.; DA COSTA, J. B.; DE SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; AYUB, M. A. Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. *Renewable Energy*, v. 39, p. 223-227, 2012.
- SAIMMAI, A.; RUKADEE, O.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 grown on crude glycerol obtained from biodiesel production plant as sole carbon source. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 71, p. 396-406, 2012.
- SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. *Microbial Cell Factories*, v. 49, p. 1-10, 2011.
- SHAO, C.; LIU, L.; GANG, H.; YANG, S.; MU, B. Structural diversity of the microbial surfactin derivatives from selective esterification approach. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 1855-1872, 2015.
- SHEMESH, M.; CHAI, Y. A Combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *Journal of Bacteriology*, v. 195, p. 2747-2754, 2013.
- SOUSA, M.; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 35, p. 897-906, 2012.
- TAN, H. W.; AZIZ, A. R. A.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 118-127, 2013.
- TANG, J.; GAO, H.; HONG, K.; YU, Y.; JIANG, M.; LIN, H. P.; YE, W.; YAO, X. Spectral assignments and reference data complete assignments of ¹H and ¹³C NMR spectral data of nine surfactin isomers. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 45, p. 792-796, 2007.
- THAVASI, R.; SUBRAMANYAM NAMBARU, V. R. M.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 30-36, 2011.
- VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* mtcc 2423 from waste frying oils. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, p. 175-180, 2011.
- WEAST, R. C. Handbook of chemistry and physics. 52 edição. Cleveland, Ohio: The Chemical Rubber CO. 1971.
- WEI, Y.; CHU, I. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 724-728, 1998.
- WEI, Y.; CHU, I. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 479-482, 2002.
- YEH, M.; WEI, Y.; CHANG, J. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 1329-1334, 2005.

*APLICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO DURANTE A BIODEGRADAÇÃO
DE MISTURAS DE DIESEL/BIODIESEL NO SOLO*

1 Introdução

O solo possui grande quantidade de micro-organismos com potencialidades bioquímicas diversas. Tais potencialidades podem beneficiar a biodegradação de misturas complexas como derivados de petróleo. As comunidades microbianas presentes naturalmente no solo podem atuar em conjunto para transformar substâncias mais complexas e recalcitrantes em substâncias menos tóxicas ou sem nenhuma toxicidade (MEGHARAJ et al., 2011; ADAMS et al., 2015; BEZZA et al., 2015).

O emprego de tecnologias de biorremediação em ambientes contaminados por derivados de petróleo deve considerar fatores como: aclimação dos micro-organismos do local; suplementação de nitrogênio e fósforo; tamanho de inóculo; disponibilidade de água; aeração; pH; temperatura; estrutura química dos compostos, entre outros. Todos esses fatores são fundamentais na efetividade do processo de biorremediação (LAHEL et al., 2016; GUARINO et al., 2017).

O petróleo e seus derivados percolam no solo, podendo atingir o lençol freático. A natureza físico-química do solo e o tamanho de suas partículas influenciam diretamente nesta percolação e na degradação do poluente. Frações de argila e silte-argila são mais susceptíveis à formação de complexos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que as frações de areia. O teor de matéria orgânica no solo também afeta o comportamento de hidrocarbonetos no solo, uma vez que apresenta elevada afinidade com estes contaminantes (TÓTH, 2009).

Devido à complexidade e variedade da composição química dos derivados do petróleo, a biodegradação destes compostos pode torná-los mais tóxicos. A busca por combustíveis de origem renováveis e menos tóxicos, os chamados combustíveis “ecofriendly”, é cada vez mais

urgente. Desta forma, o biodiesel surge como uma alternativa aos combustíveis de origem petroquímica.

O artigo 1º da Lei nº 13.033 estabeleceu em novembro de 2014 que o óleo diesel comercializado em todo território nacional contenha percentual de 7 % de biodiesel. A mesma Lei prevê o aumento gradativo do percentual até valores de 27,5 %, com o passar dos anos, desde que comprovada a eficácia técnica do combustível. Para chegar a tal percentual, vem sendo praticada a adição progressiva do biodiesel no óleo diesel, o que poderá elevar para 10 % o percentual de biodiesel no óleo diesel nos próximos anos (BRASIL, 2016).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a biodegradação das misturas diesel/biodiesel em solo, bem como a fitotoxicidade após 90 dias de incubação do solo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar, por respirometria, a atividade microbiana no solo contaminado com as misturas diesel/biodiesel a 5 %, 7 % e 10 % (B5, B7 e B10) utilizando respirômetros.

- Avaliar o efeito na atividade microbiana do solo contaminado com as misturas B5, B7 e B10, quando adicionado biossurfactante a 5 %.

- Analisar a fitotoxicidade do solo contaminado, tanto por contato direto como por lixiviado após 90 dias de incubação do solo.

- Comparar a quantidade de UFC bacteriana e fúngica no solo após 90 dias.

- Avaliar a eficiência do glicerol como um potencial co-substrato para a atividade microbiana frente aos contaminantes.

3 Revisão bibliográfica

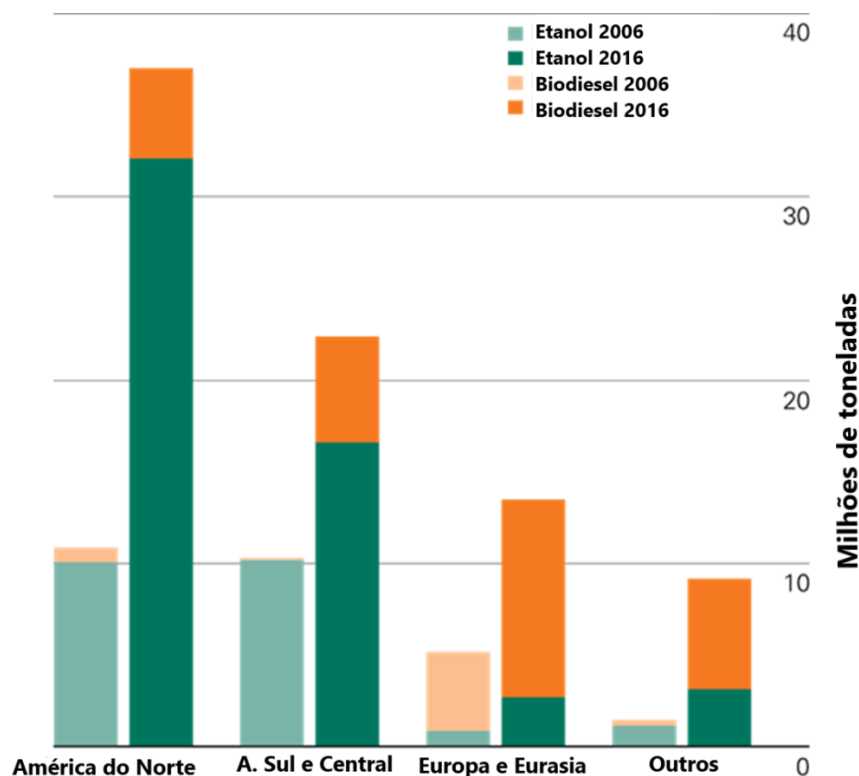
3.1 Introdução de biocombustíveis na matriz energética

A introdução dos biocombustíveis na matriz energética brasileira teve início com o uso de etanol como combustíveis automotivos em 14 de novembro de 1975. O decreto n° 76.593 criou o Proálcool, que visava a substituição de gasolina por álcool (BRASIL, 1975).

O histórico do biodiesel vem desde 1895, quando Rudolf Diesel criou o primeiro motor que funcionava com óleo de amendoim. Segundo Rudolf Diesel, o motor a diesel poderia ser alimentado por óleos vegetais, beneficiando o desenvolvimento agrário dos países que vierem a utilizá-lo. Portanto, o motor mais utilizado no mundo foi projetado com plenas condições de ser alimentado com óleo de origem vegetal. No entanto, a utilização de óleos vegetais em motores foi inviabilizada devido a razões políticas, econômicas e sociais. Somente na década de 50 surgiu o óleo que proporcionou altos rendimentos e baixo consumo de combustível, o que conhecemos atualmente como óleo diesel (POUSA et al., 2007; SILVA, 2008).

Com a elevação dos preços do óleo diesel e o interesse do Governo Federal em reduzir a importação, o Ministério da Ciência e Tecnologia lançou o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (Probi biodiesel) em 2002. O programa era destinado a fomentar a produção e uso desse produto. Contudo, o biodiesel só passou a fazer parte da matriz energética brasileira a partir da criação de um marco regulatório em 13 de janeiro de 2005, por meio da Lei 11.097 (BRASIL, 2005; POUSA et al., 2007). A partir da criação deste marco regulatório, o biodiesel começou a ser introduzido em pequenas porcentagens no diesel e, atualmente, todo óleo diesel consumido em território nacional contém 7 % de biodiesel misturado ao óleo diesel (BRASIL, 2014). Essa porcentagem está prevista para aumentar gradativamente, segundo o artigo 1° da Lei n° 13.263, de 23 de março de 2016. Esta lei prevê o aumento de 10 % de biodiesel na mistura com o óleo diesel até 2019.

A mistura de biodiesel no óleo diesel e a pressão mundial por utilização de combustíveis menos poluentes fez a produção de etanol e biodiesel aumentarem no Brasil e no mundo como registrado na Figura 1.

Figura 1 - Produção mundial de etanol e biodiesel no período de 2006 a 2016.

Fonte: BP Statistical Review of World Energy, 2017.

3.2 Biorremediação de derivados do petróleo

Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas para diminuir os impactos ambientais causados por derramamento de petróleo e seus derivados, dentre elas destaca-se a biorremediação (MILLIOLI et al., 2008). Esta técnica utiliza a capacidade de organismos vivos, principalmente micro-organismos, biodegradar contaminantes ambientais e transformá-los em outros compostos menos tóxicos (VIDALI, 2001). A bioaugmentação e a bioestimulação são estratégias capazes de acelerar o processo de biorremediação (TYAGI et al., 2011).

A adição de substâncias que estimulam a biodegradação, como nitrogênio, fósforo e micronutrientes como ferro, manganês ou até mesmo surfactantes e biosurfactantes, é uma estratégia usada no campo da biorremediação para acelerar o processo de biodegradação por micro-organismos que já fazem parte da microbiota local (KOSHLAF et al., 2016; TYAGI et al., 2011). A adição de co-substratos, em alguns casos, pode aumentar a biodegradação, devido ao aumento de micro-organismos que o co-substrato proporciona. A biodegradação de HAP aumentou significativamente com a adição 0,2 % de óleo de amendoim (PANNU et al., 2003).

Os biossurfactantes são capazes de solubilizar o óleo diesel por reduzir a tensão interfacial entre a porção hidrofóbica do hidrocarboneto e a fase aquosa (DESAI e BANNAT, 1997; AYED et al., 2015). Em alguns casos a microbiota local pode ser muito afetada pela contaminação, e não reagir ao estímulo. Nessa situação é necessário a introdução de micro-organismos com alto poder de utilizar a contaminação como fonte de carbono. Esta estratégia de biorremediação é denominada bioaumentação.

A biodegradação de hidrocarbonetos como o óleo diesel promove uma forte seleção dos micro-organismos autóctones e exige uma sucessão microbiana com capacidades metabólicas diferentes para biodegradar os diversos compostos do óleo diesel e, também, os compostos intermediários provindos do processo de biodegradação (KOSTKA et al., 2011). A presença de subprodutos e intermediários resultantes do processo pode, em algumas situações, causar toxicidade maior ou igual ao composto original (NUNES-HALLDORSON et al., 2004).

Os principais organismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos derivados do petróleo são as bactérias e os fungos. Plaza et al. (2008) isolaram 4 linhagens bacterianas identificadas como: *Ralstonia picketti*, *Alcaligenes piechaudii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp capazes de biodegradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP).

A biodegradação de petróleo e seus derivados, geralmente, segue uma ordem, na qual os *n*-alcanos são os primeiros a serem biodegradados, seguidos de alcanos de cadeia ramificada, aromáticos de baixo peso molecular, monoarômáticos, alcanos cíclicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e por último, asfaltenos (VAN HAMME et al., 2003).

Atualmente todo o óleo diesel comercializado em território nacional possui um percentual de 7 % de biodiesel misturado ao diesel (BRASIL, 2014). Essa mistura de biodiesel-diesel muda as características de ambos os componentes e torna a mistura diferente dos óleos que a compõem. A microbiota responsável pela biodegradação desta mistura também pode ser muito alterada, dependendo da quantidade de biodiesel na mistura (SORIANO et al., 2015; SØRENSEN et al., 2011).

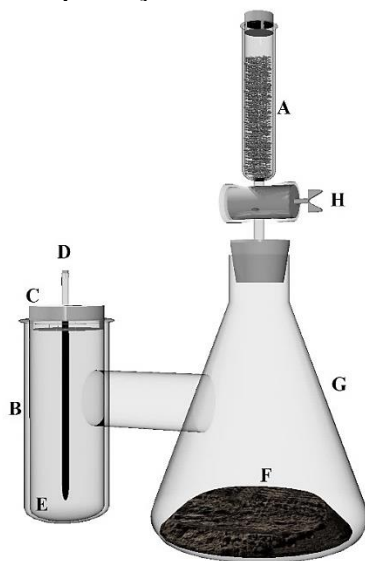
3.3 Respirômetro de Bartha & Pramer

A respiração do solo é considerada como um indicador de atividade microbiana. A respiração pode ser avaliada mediante quantificação do gás carbônico produzido durante a respiração.

A respiração do solo está intimamente relacionada à quantidade de matéria orgânica e à quantidade de micro-organismos existentes neste solo. Assim, qualquer substância orgânica introduzida no meio refletirá na respiração do solo. Por esse fato, os respirômetros são muito utilizados em estudos de biodegradação aeróbia de compostos orgânicos (MARIANO et al., 2008; TAMADA et al., 2012). Por meio destes respirômetros, é possível quantificar a produção de CO₂ e, conseqüentemente, estimar a biodegradação do composto orgânico em questão.

O respirômetro de Bartha & Pramer (BARTHA e PRAMER, 1965) é um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas como esquematizado na Figura 2. Em uma das câmaras é acondicionado o material a ser biodegradado e na outra câmara a solução de KOH responsável pela captação do CO₂ produzido pela atividade microbiana.

Figura 2 - Respirômetro de Bartha. A = ascarita, B = câmara onde o CO₂ proveniente da biodegradação é captado, C = rolha de borracha para vedar as câmaras, D = cânula, E = local onde fica armazenada a solução de KOH, F = amostra a ser biodegradada, G = Câmara onde ocorre a produção de CO₂, H = válvula.



Fonte: elaborada pelo autor.

O método original proposto por Bartha & Pramer utiliza da quantificação de dióxido de carbono (CO₂) que reage com o hidróxido de potássio (KOH), formando carbonato de potássio (K₂CO₃) como na equação 01. A quantificação de CO₂ é medida por titulação.



No entanto, é possível quantificar a produção de CO_2 dos sistemas respirométricos por meio da condutividade (STROTMANN et al., 2004; FARIA e DE ANGELIS, 2014). Esta metodologia está fundamentada na capacidade de solubilização de álcalis e carbonatos de metais alcalinos, liberando íons capazes de conduzir corrente elétrica. Desta forma, quanto mais CO_2 reagir com o KOH , maior será a quantidade de K_2CO_3 , o que, conseqüentemente, reduzirá a condutividade da solução.

4 Material e métodos

4.1 Coleta do solo para teste de respirometria

O solo foi coletado e peneirado em uma malha com granulometria de 1,50-2,00 mm. Uma amostra de solo foi submetida a análise físico-química pelo laboratório de análise de solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo em Piracicaba, SP.

4.2 Montagem dos respirômetros de Bartha & Pramer

A montagem dos respirômetros seguiu metodologia descrita pela NBR 14283 (ABNT, 1999) com adaptações. O solo utilizado nos respirômetros foi peneirado para obter um solo com granulometria menor ou igual a 1,5-2,0 mm. A umidade natural do solo foi calculada pesando o solo em balança analítica ADA 210/L antes e após secagem em estufa a 105 °C. Os respirômetros foram montados em triplicatas, onde cada respirômetro continha 50,0 g de solo peneirado, pesado em balança Shimadzu BL3200H e 5,0 mL da mistura diesel/biodiesel. Em todos os respirômetros, a umidade foi ajustada para aproximadamente 20 %, adicionando quando necessário, água desionizada.

O biodiesel utilizado para compor as misturas era de origem vegetal (soja). As misturas de biodiesel e diesel foram feitas nas seguintes proporções em v/v: **B5** (*Biodiesel 5 %/95 % Diesel*), **B7** (*Biodiesel 7 %/93 % Diesel*) e **B10** (*Biodiesel 10 %/90 % Diesel*). Na Tabela 1 estão descritas as misturas de biodiesel e diesel nos sistemas respirométricos. A solução de biossurfactante adicionada ao solo foi preparada a 1,0 mg mL⁻¹. O glicerol foi adicionado como suplemento aos sistemas respirométricos na proporção de 2,10 g de glicerol por kg de solo. Os respirômetros foram acondicionados em incubadora BOD Solab SL-224 a 28°C por 90 dias.

Tabela 1 - Mistura de biodiesel/diesel e biossurfactante nos respirômetros.

<i>Sistemas</i>	<i>Contaminante (mL)</i>	<i>Biossurfactante (mL)</i>	<i>Água (mL)</i>	<i>Glicerol (g)</i>
<i>B5</i>	5,0	---	5,0	--
<i>B5+Biossurfactante</i>	5,0	5,0	---	--
<i>B5+Glicerol</i>	5,0	---	5,0	0,1
<i>B5+Glicerol+ Biossurfactante</i>	5,0	5,0	---	0,1
<i>B7</i>	5,0	---	5,0	--
<i>B7+ Biossurfactante</i>	5,0	5,0	---	--
<i>B7+Glicerol</i>	5,0	---	5,0	0,1
<i>B7+Glicerol+ Biossurfactante</i>	5,0	5,0	---	0,1
<i>B10</i>	5,0	---	5,0	--
<i>B10+Biossurfactante</i>	5,0	5,0	---	--
<i>B10+Glicerol</i>	5,0	---	5,0	0,1
<i>B10+Glicerol+Biossurfactante</i>	5,0	5,0	---	0,1
<i>Controle do solo</i>	---	5,0	5,0	--
<i>Controle biossurfactante</i>	---	5,0	5,0	--
<i>Controle glicerol</i>	---	---	5,0	0,1

A contaminação do solo com os seguintes compostos citados acima foi realizada, primeiramente, dentro de sacos plásticos para permitir a máxima homogeneização entre todos os componentes e o solo e depois foram transferidas para os respirômetros.

As características físico-químicas do solo no início dos testes de biodegradação estão relacionadas na Tabela 2. Trata-se de um solo de textura média com pouca matéria orgânica.

Tabela 2 - Composição físico-química do solo utilizado nos respirômetros.

<i>Composição físico-química</i>	
<i>Boro</i>	0,19 mg.dm ³
<i>pH CaCl₂</i>	4,6
<i>Areia Total</i>	676 g kg ⁻¹
<i>Cobre (DTPA) *</i>	1,7 mg. dm ³
<i>Matéria orgânica (M.O.)</i>	40 g.dm ⁻³
<i>Ferro (DTPA)</i>	60 mg.dm ⁻³
<i>P (Resina)</i>	6 mg.dm ⁻³
<i>Silte</i>	22 g kg ⁻¹
<i>Manganês (DTPA)</i>	34,1 mg.dm ⁻³
<i>S (Fosfato de cálcio 0,01 mol L⁻¹)</i>	<4 mg.dm ⁻³
<i>K (Resina)</i>	1,2 mmolc.dm ³
<i>Zn (DTPA)</i>	2,2 mg.dm ³
<i>Ca (Resina)</i>	10 mmolc.dm ³
<i>Argila (c/ dispersão) **</i>	232 g kg ⁻¹
<i>Mg (Resina)</i>	5 mmolc.dm ³
<i>Al por colorimetria (KCl 1 mol.L⁻¹)</i>	4 mmolc.dm ³
<i>H+Al (SMP) ***</i>	52 mmolc.dm ³

* Método DTPA, utiliza a solução de ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA) para extração de micronutrientes. ** Método para determinação da textura do solo separa frações de areia, Silte e argila utilizando dispersão mecânica e dispersante químico, as partículas maiores que 50 µm são separados por peneiramento e a separação da argila e Silte por sedimentação diferencial. ***Método SMP, acrônimo de Shoemaker, Mc Lean e Pratt, é um método utilizado na avaliação da acidez potencial (SHOEMAKER et al., 1961).

4.3 Medidas de CO₂ por condutividade

A produção de CO₂ nos respirômetros foi medida de forma indireta com base na condutividade da solução de KOH em períodos determinados. Para calcular a quantidade de CO₂ foi necessária a construção de uma curva de calibração com KOH e K₂CO₃. O método considera o balanço estequiométrico entre a reação de KOH e K₂CO₃ para calcular a quantidade de CO₂ produzido (equação 02).



Os dados da Tabela 3 geraram uma equação linear relacionando a quantidade de CO₂ na solução e as medidas de condutividade da solução. Com base na equação foi possível calcular a concentração de CO₂ em mg e depois transformá-las em mmol.

A solução de KOH 0,4 M foi preparada com hidróxido de potássio (P.A. Synth) e água desionizada livre de CO₂. A solução de K₂CO₃ 0,2 M foi preparada com carbonato de potássio (P.A. Anidrol), e água desionizada livre de CO₂.

Para padronizar a solução de KOH 0,4 M foi utilizada solução de biftalato de potássio C₈H₅KO₄ (P.A. Synth) de massa conhecida e 2 gotas de fenolftaleína como indicador. A solução de biftalato também foi preparada com água desionizada livre de CO₂. A solução de K₂CO₃ 0,2 M não necessitou de padronização, por se tratar de um padrão primário. As soluções de KOH dos respirômetros foram aferidos em condutivímetro Tecnon CA150 semanalmente e depois calculadas a produção de CO₂, com base na curva de calibração.

Tabela 3 - Composição das soluções, condutividade e respectivos valores de quantidade de dióxido de carbono para construção da curva de calibração.

<i>KOH 0,4 M (mL)</i>	<i>K₂CO₃ 0,2 M (mL)</i>	<i>Condutividade (mS cm⁻¹)</i>	<i>mg de CO₂</i>
10,0	0,0	19,80	0
9,0	1,0	19,40	8,8
8,0	2,0	18,69	17,6
7,0	3,0	17,70	26,4
6,0	4,0	16,70	35,2
5,0	5,0	15,43	44,0
4,0	6,0	14,20	52,8
3,0	7,0	12,92	61,6
2,0	8,0	11,58	70,4
1,0	9,0	10,15	79,2
0,0	10,0	8,93	88,0

4.4 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os solos dos respirômetros foram utilizados para contagem de UFC do solo. Para realizar a contagem, 1,0 g de cada amostra de solo foi colocada em 9,0 mL de solução salina de NaCl 0,85 %. A suspensão foi então agitada a 180 rpm em mesa agitadora Catel durante 1 h. Após esse período 1,0 mL da solução foi retirada para ser utilizada na diluição seriada. O plaqueamento foi realizado pela técnica de *pour plate*. O meio *plate count agar* da Difco foi utilizado para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas e o meio Sabouraud, da Acumedia, foi utilizado para contagem de fungos. Os meios foram esterilizados em autoclave e, posteriormente, mantidos a 45 °C até a utilização. Foi adicionado cloranfenicol levogiro (P. A. Inlab) no meio Sabouraud, para inibir o crescimento de bactérias.

4.5 Teste de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* (contato direto)

Os solos dos sistemas respirométricos foram submetidos ao teste de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*, seguindo metodologia descrita por Cruz et al. (2014). O solo foi distribuído uniformemente em placas de Petri. Foram colocadas 20 sementes Isla® em cada placa e umidificadas com 3,0 mL de água desionizada. As sementes foram mantidas em incubadora BOD Solab SL-224 a 22 °C±1 por 120 h no escuro. Foram aferidos o alongamento das raízes e calculados as médias de alongamentos das raízes e os desvios médios das amostras, em cada tratamento e no controle.

4.6 Teste de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* (lixiviado do solo)

Os testes de fitotoxicidade também foram realizados com o lixiviado do solo dos respirômetros seguindo metodologia proposta por Sobrero e Ronco (2004), com adaptações. Para realizar o teste com o lixiviado, foi colocado 10,0 g de solo do respirômetro em erlenmeyer de 250,0 mL e diluídos em 50,0 mL de água desionizada. O lixiviado foi colocado em mesa agitadora Catel a 150 rpm por 24 h. Após esse período, foi retirado com pipeta graduada 3,0 mL do sobrenadante e colocados em placas de Petri contendo um papel filtro. As placas continham 20 sementes de *L. sativa* Isla®, isentas de fungicidas.

As placas com as sementes foram mantidas em incubadora BOD Solab SL-224 a 22 °C±1 por 120 h no escuro. Posteriormente, foi determinado o alongamento da raiz e realizada a média desses alongamentos. O desvio médio do alongamento da raiz foi calculado para cada lixiviado de solo correspondente ao sistema respirométrico e, também, para os controles.

5 Resultados e discussão

5.1 Respirômetria do solo contaminado com misturas biodiesel/diesel

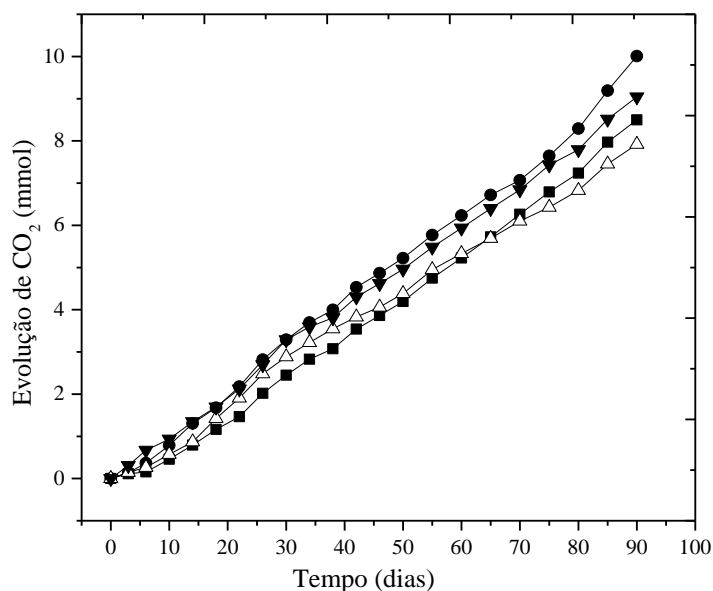
A quantidade de CO₂ acumulado foi calculada com base na curva de calibração descrita no item 4.3 deste capítulo. A equação 03 determina a concentração de CO₂, de acordo com a condutividade da solução de KOH.

$$y = -7,3201x + 155,05 \quad (r^2 = 0,994) \quad \text{equação 03}$$

Por meio da equação 03, foi calculado a produção de CO₂ e depois transformados em milimol (mmol) de CO₂. A quantidade de CO₂ produzida pelo solo controle foi subtraída da quantidade de CO₂ produzida em cada amostra contaminada. Assim, estão representados na Figura 3, 4 e 5 a quantidade de CO₂ produzido pela adição da contaminação do solo durante 90 dias de incubação. O solo sem contaminação com adição de biossurfactante e outro com adição de glicerol também foram monitorados como controle.

A Figura 3 mostra a produção de CO₂ no solo contaminado com as misturas B5 (5 % biodiesel/95 % diesel). A adição de biossurfactante na mistura B5 (B5 Bio) produziu 10 mmol de CO₂, o que mostrou pequena melhora na respiração do solo em relação ao solo sem biossurfactante. Já a adição de glicerol na mistura B5 reduziu a produção de CO₂ para 7,91 mmol de CO₂ sendo a menor quantidade de CO₂ acumulado após 90 dias. A quantidade de CO₂ produzida pela mistura B5 está acima da quantidade de CO₂ descrita em outros trabalhos Soriano et al. (2015) observaram produção de 100 umol (0,1 mmol) de CO₂, após 42 dias de biodegradação da mistura B5. Portanto, pode-se sugerir que no presente estudo a microbiota selecionada pela contaminação foi capaz de assimilar a mistura B5 como fonte de carbono.

Figura 3 - CO₂ acumulado produzido pelo solo contaminado com mistura B5 (5 % biodiesel/95 % diesel) (■); B5 Bio (5 % biodiesel/95 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %) (●); B5 GL (5 % biodiesel/95 % diesel e glicerol) (Δ); B5 Bio GL (5 % de biodiesel/95 % diesel, biossurfactante e glicerol) (▼). Para melhor compreensão das concentrações utilizadas vide Tabela 1.

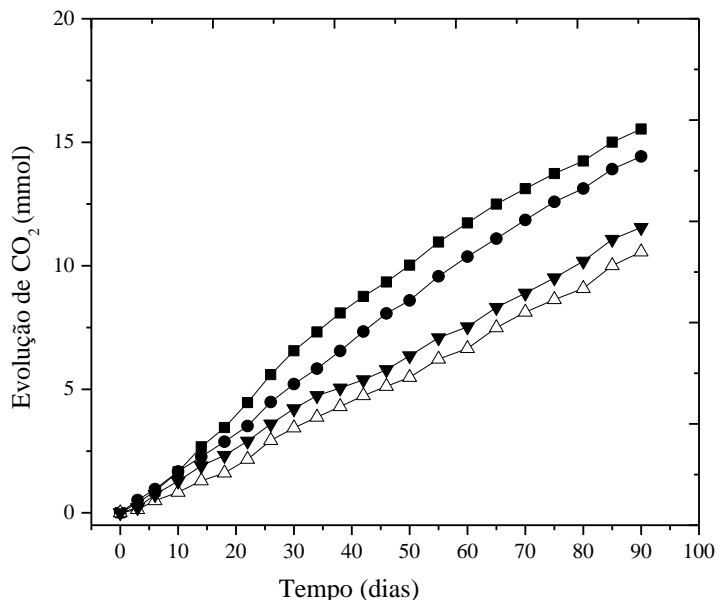


Fonte: elaborada pelo autor.

O solo contaminado com a mistura B7 (7 % biodiesel/ 93 % diesel) produziu 15,53 mmol de CO₂ acumulado ao final do período de incubação. A mistura B7 com adição do biossurfactante produziu 14,42 mmol de CO₂. A adição do glicerol, como potencial co-substrato na mistura B7, não apresentou bom resultado. Ao contrário do esperado, a adição do glicerol reduziu a respiração do solo produzindo apenas 10,56 mmol de CO₂. Para o solo contaminado com a mistura B7 e adição de glicerol e biossurfactante juntos produziu 11,54 mmol de CO₂ acumulado ao final de 90 dias.

Os resultados dos respirômetros mostraram que a mistura B7 causou um aumento de 82,92 % na produção de CO₂ acumulado em comparação à amostra B5. Quando comparado às misturas B5 Bio e B7 Bio (adicionadas biossurfactantes), a mistura B7 Bio apresenta um aumento de 44,2 % em termos de produção de CO₂.

Figura 4 - CO₂ acumulado produzido pelo solo contaminado com B7 (7 % biodiesel/93 % diesel) (■); B7 Bio (7 % biodiesel/93 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %) (●); B7 GL (B7 % biodiesel/93 % diesel e glicerol) (Δ); B7 Bio GL (7 % biodiesel/93 % diesel, biossurfactante e glicerol) (▼).



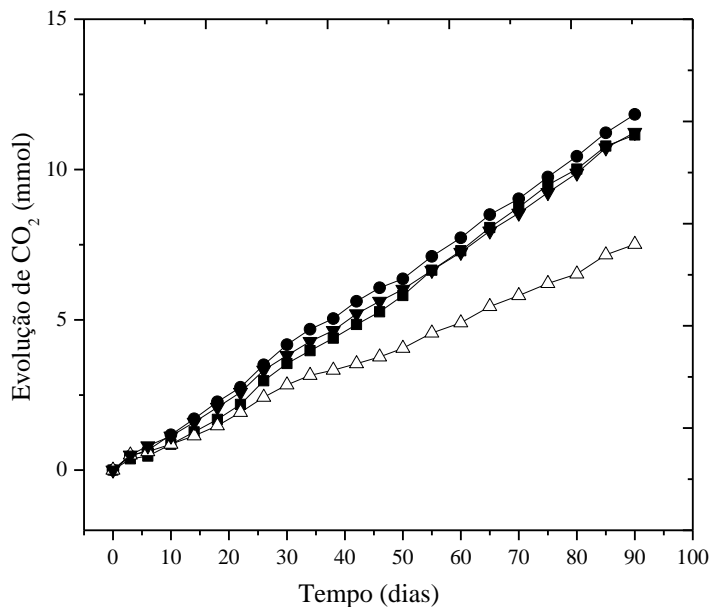
Fonte: elaborada pelo autor.

O solo contaminado com a mistura B10, apesar de possuir maior quantidade de biodiesel na mistura (10 % biodiesel/90 % diesel), não garantiu uma biodegradação mais rápida que as amostras com menores quantidades de biodiesel na mistura como observado na Figura 5. A mistura B10 produziu 11,14 mmol de CO₂ acumulado ao final de 90 dias de incubação. A adição do biossurfactante na mistura B10 não teve um efeito de acelerar a biodegradação, tendo uma produção de CO₂ acumulado de 11,84 mmol ao final de 90 dias, valor muito similar a mistura B10 sem adição do biossurfactante.

Embora a mistura B10 tenha maior quantidade de biodiesel, não houve aumento de produção de CO₂ acumulado em relação a mistura B7. Ao contrário, a mistura B7 produziu 39,40 % mais CO₂ que a mistura B10.

A adição de glicerol como co-substrato no solo contaminado com a mistura B10 (B10 GL) afetou a atividade microbiana, a produção acumulada de CO₂ foi de apenas 7,51 mmol de CO₂.

Figura 5 - CO₂ acumulado produzido pelo solo contaminado com B10 (10 % biodiesel/90 % diesel) (■); B10 Bio (10 % biodiesel/90 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %) (●); B10 GL (10 % biodiesel/90 % diesel e glicerol) (△); B10 Bio GL (10 % biodiesel/90 % diesel, biossurfactante e glicerol) (▼).



Fonte: elaborada pelo autor.

Em todas as misturas de biodiesel/diesel, a adição de glicerol como um suplemento não apresentou um aumento na atividade dos micro-organismos do solo. Ao contrário do esperado, a adição do glicerol reduziu a respiração dos micro-organismos do solo. O glicerol tem uma forte influência osmótica no interior da célula microbiana (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, 2015). Assim, a adição de glicerol, mesmo que em baixas concentrações, pode ter afetado a microbiota responsável pela biodegradação das misturas.

A mistura B7 produziu maior quantidade de CO₂ que a mistura B10, a qual contém maior quantidade de biodiesel. Portanto, o aumento da concentração de biodiesel não garantiu maior produção de CO₂ nos respirômetros. A mistura B7 também apresentou a maior quantidade de UFC tanto bacteriana quanto fúngica. O impacto da adição de biodiesel no diesel, em termos de biodegradação, também foi discutida por Ng et al. (2015). Em resumo, este estudo mostrou que a mistura de até 50 % de biodiesel ao diesel supera a produção de CO₂, quando comparado a produção de CO₂ apenas do biodiesel puro.

O biodiesel adicionado ao óleo diesel é capaz de mudar as características de cada composto da mistura, tornando um terceiro composto com propriedades químicas únicas. Yassine et al. (2013) mostraram que o biodiesel é capaz de co-solubilizar o diesel reduzindo a

tensão superficial entre a fase aquosa e os n-alcanos. Desta forma, estes compostos solubilizados na fase aquosa estariam biodisponíveis aos micro-organismos. Portanto, a porcentagem de biodiesel adicionado a mistura proporciona condições específicas para o desenvolvimento de determinados consórcios microbianos (SØRENSEN et al., 2011). Com base nessas informações, não é possível relacionar de forma direta a maior produção de CO₂ com maior quantidade de biodiesel na mistura.

Os resultados respirométricos apresentados neste trabalho sugerem que existe um consórcio microbiano distinto para cada mistura com capacidade de biodegradação diferentes, independente da porcentagem de biodiesel existente em cada mistura. Por isso, a mistura B7, embora com menor porcentagem de biodiesel que B10, produziu uma quantidade de CO₂ maior, fato também observado em outros estudos na literatura (YASSINE et al., 2013).

De modo geral, a adição do biossurfactante na concentração de 5 % não acelerou o processo de biodegradação. A solução de biossurfactante utilizado neste estudo não passou por nenhum processo de purificação. Portanto, a concentração apenas de biossurfactante no extrato bruto pode ser muito baixa.

5.2 Contagem de UFC nas amostras de solo dos respirômetros

A contagem de UFC dos solos dos respirômetros incubados durante 90 dias está registrado na Tabela 4. A contagem de UFC mostra que a adição do biossurfactante a concentração de 5 % não provocou inibição da microbiota responsável pela biodegradação das misturas. Alguns estudos indicam a ação bactericida e fungicida de alguns biossurfactantes (KIM et al., 2010; PLAZA et al., 2013). Na mistura B5, a quantidade de UFC bacteriana é muito maior que nas misturas B5 Bio, B5 GL e B5 Bio GL. Por outro lado, todas as misturas B5 apresentam, aproximadamente, a mesma quantidade de UFC fúngica.

Nas misturas B7 e B7 Bio, a quantidade de UFC bacterianas/mL foram $44,5 \times 10^6$ e 93×10^6 , respectivamente. A grande quantidade de UFC nas misturas B7 e B7 Bio refletem os resultados dos respirômetros, pois devido à grande quantidade de micro-organismos, as duas amostras também produziram as maiores quantidades de CO₂ (ver item 4.1). Nas misturas B7 GL e B7 Bio GL apresentaram baixas quantidades de UFC bacteriana e fúngica. A mistura B10 e suas variações apresentaram inibição para UFC bacterianas. O método de contagem de UFC não foi capaz de detectar a comunidade bacteriana nas misturas de B10 e suas variações. Essa inibição pode ser causada pela acidificação que o biodiesel pode causar no solo durante o

período de biodegradação (CRUZ et al., 2013; SORIANO et al., 2015), baixos valores de pH são altamente impactantes para o crescimento de bactérias. No presente estudo, a influência do pH como agente inibidor do crescimento de bactérias pode ser corroborado pelo crescimento de fungos que ainda permanece para os solos contaminados com as misturas B10. Os fungos são capazes de crescer em baixos pH. Meyer et al. (2014) relacionaram a maior produção de CO₂ com aumento da diversidade bacteriana do solo. Soriano et al. (2015) relataram que a concentração de biodiesel adicionado a mistura diesel/biodiesel causa grandes mudanças no perfil microbiano após 41 dias de incubação.

Tabela 4 - Contagem de UFC do solo incubados durante 90 dias.

		PCA		SDA				
<i>Controle solo</i>		85 x10 ⁴		6 x10 ⁴				
<i>Controle biossurfactante</i>		95 x10 ⁴		8,5 x10 ⁴				
	PCA	SDA	PCA	SDA	PCA	SDA		
<i>B5</i>	37 x10 ⁶	9,5 x10 ³	<i>B7</i>	44,5 x10 ⁶	22,5 x10 ³	<i>B10</i>	<10	1 x10 ⁴
<i>B5 Bio</i>	10,5 x10 ⁶	13 x10 ³	<i>B7 Bio</i>	93 x10 ⁶	9,5 x10 ³	<i>B10 Bio</i>	<10	10 x10 ⁴
<i>B5 GL</i>	10 x10 ⁶	11 x10 ³	<i>B7 GL</i>	5 x10 ⁶	1,5 x10 ³	<i>B10 GL</i>	<10	10 x10 ⁴
<i>B5 Bio GL</i>	6 x10 ⁶	12 x10 ³	<i>B7 Bio GL</i>	8,5 x10 ⁶	3 x10 ³	<i>B10 Bio GL</i>	<10	8 x10 ⁴

PCA: plate count agar; **SDA:** Sabouraud; **B5:** mistura 5 % biodiesel/95 % diesel; **B7:** mistura 7 % biodiesel/93 % diesel; **B10:** mistura 10 % biodiesel/90 % diesel; **Bio:** biossurfactante; **GL:** glicerol. Dados registrados em UFC/mL.

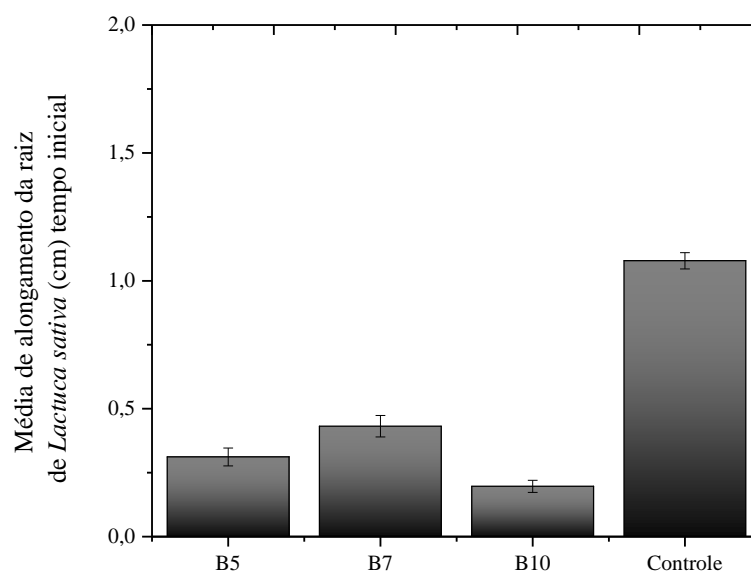
5.3 Teste de fitotoxicidade em solo (contato direto)

O solo contaminado foi submetido a teste com sementes de *Lactuca sativa* para analisar o potencial fitotóxico da contaminação das misturas biodiesel/diesel antes e após o período de biodegradação.

Na Figura 6 está descrito a média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo logo após a contaminação. A adição das misturas B5, B7 e B10 reduziram o desenvolvimento da raiz em relação ao solo sem contaminação (controle). A maior inibição ocorreu no solo com a mistura B10, a qual contém a maior quantidade de biodiesel na mistura.

A fitotoxicidade do biodiesel no tempo inicial de contaminação também foi observada em outros estudos (CRUZ et al., 2014). Na mistura biodiesel/diesel a solubilidade do diesel é aumentada devido a adição do biodiesel (YASSINE et al., 2013). Assim, os compostos do diesel podem ter maior contato com a semente e provocar inibição.

Figura 6 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) com as misturas de biodiesel/diesel e a amostra controle (sem contaminação) no tempo inicial (logo após a contaminação).

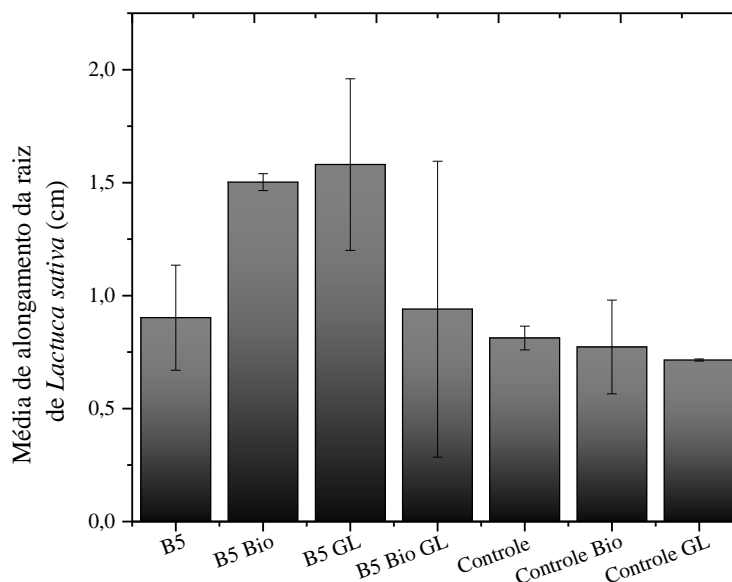


Fonte: elaborado pelo autor.

Em muitos trabalhos descritos na literatura a fitotoxicidade é dada em porcentagem de inibição do alongamento da raiz em relação ao controle (TAM e TIQUIA, 1994; ARAÚJO e MONTEIRO, 2005; BOLUDA et al., 2011). Porém neste estudo, foi adotado a média das medidas absolutas das raízes, pois em alguns casos as raízes podem crescer mais no solo no qual sofreu a contaminação que no solo controle. Deste modo, se fossem representados em porcentagem de fitotoxicidade, esta porcentagem teria valor negativo.

Na Figura 7 está descrito a média de alongamento da raiz de *Lactuca sativa* em solo contaminado com as misturas B5 após 90 dias de incubação. Neste período, o alongamento da raiz foi maior em todos os solos contaminados que no solo controle. A adição do biossurfactante na mistura B5 teve o mesmo desempenho em termos de produção de CO₂, comparado com a amostra B5 apenas (ver item 4.2).

Figura 7 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) com a mistura B5 (5 % biodiesel/95 % diesel); B5 Bio (5 % biodiesel/95 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B5 GL (5 % biodiesel/95 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (5 % de biodiesel/95 % diesel e biossurfactante e glicerol) após 90 dias de biodegradação. O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL).

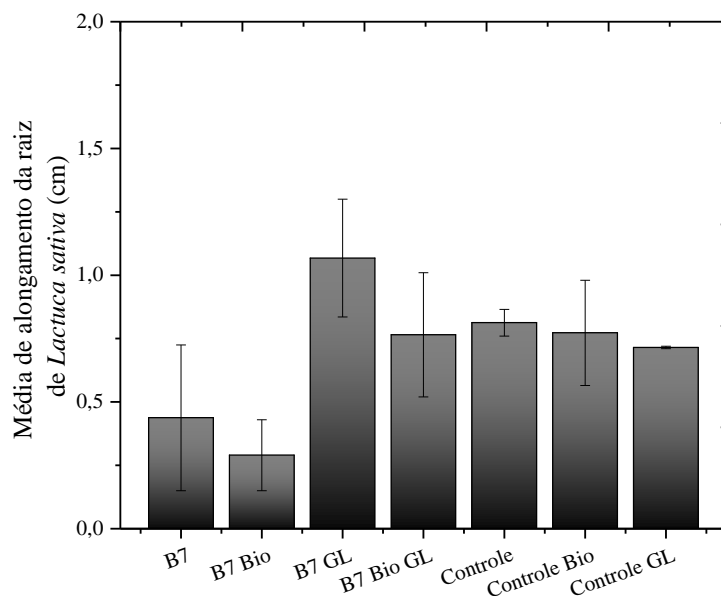


Fonte: elaborada pelo autor.

As sementes expostas ao solo contaminado com a mistura B5 e adição de glicerol (B5 GL) proporcionaram o maior crescimento das raízes dentre todas as amostras contaminadas. Foi possível observar também que a fitotoxicidade foi reduzida visto que no tempo inicial as raízes não ultrapassaram 0,5 cm no solo contaminado com a mistura B5.

O solo contaminado com a mistura B7 e B7 Bio (adicionado biossurfactante) produziram a maior quantidade de CO₂ dentre as misturas estudadas. Por outro lado, essas misturas foram responsáveis pela redução da média de alongamento das raízes como observado na Figura 8. A amostra B7 adicionado glicerol (B7 GL) e B7 adicionado biossurfactante e glicerol juntos (B7 Bio GL) apresentaram média de alongamento maior que o controle, embora essas amostras tenham produzido pouco CO₂ dentre as misturas B7. Assim, pode-se sugerir que a biodegradação dessas amostras formaram compostos intermediários da biodegradação da mistura B7, os quais as raízes de *Lactuca sativa* conseguiram absorver reduzindo a média de alongamento da raiz.

Figura 8 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) B7 (7 % biodiesel/93 % diesel); B7 Bio (7 % biodiesel/93 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B7 GL (7 % biodiesel/93 % diesel e glicerol); B7 Bio GL (7 % de biodiesel/93 % diesel e biossurfactante e glicerol) após 90 dias de biodegradação. O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL).

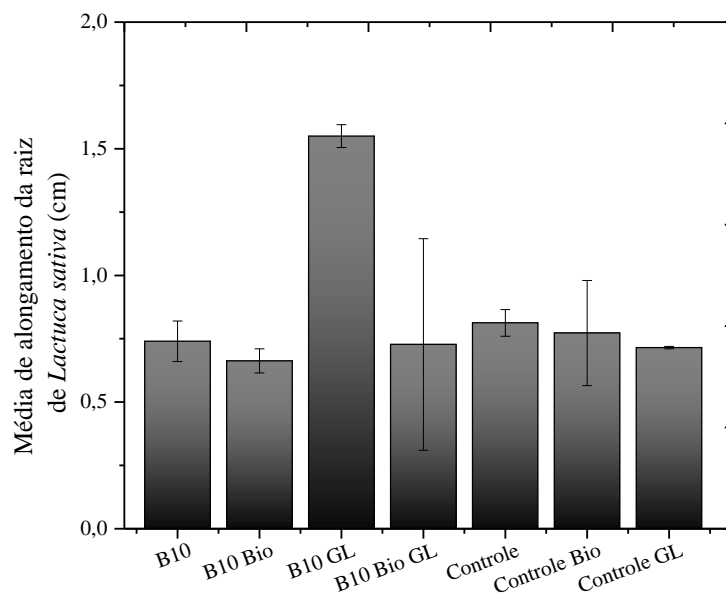


Fonte: elaborada pelo autor.

O alongamento da raiz de *L. sativa* no solo contaminado com a mistura B10 e B10 com adição de biossurfactante (B10 Bio) apresentou alongamento da raiz de 0,74 cm e 0,66 cm, valores similares ao solo controle como registrado na Figura 9. Por outro lado, a mistura B10 adicionado glicerol (B10 GL), o qual produziu a menor quantidade de CO₂ nos testes respirométricos, proporcionou um alongamento da raiz maior que o solo controle.

Comparando a fitotoxicidade do solo contaminado com a mistura B10 no tempo inicial e após 90 dias pode-se observar que houve uma redução da fitotoxicidade do solo.

Figura 9 - Média de alongamento da raiz de *L. sativa* em solo contaminado (contato direto) com a mistura B10 (10 % biodiesel/90 % diesel); B10 Bio (10 % biodiesel/90 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B10 GL (10 % biodiesel/90 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (10 % de biodiesel/90 % diesel e biossurfactante e glicerol) após 90 dias de biodegradação. O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL).



Fonte: elaborado pelo autor.

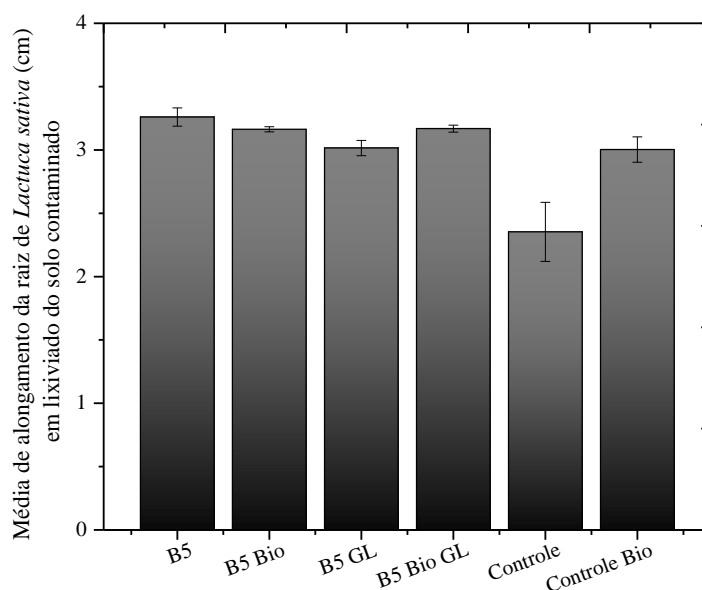
De modo geral, a média de alongamento da raiz após o período de biodegradação é maior que no teste inicial. Enquanto no período inicial, as raízes não passavam de 0,5 cm quando expostas ao solo contaminado, nos ensaios após 90 dias, o alongamento das raízes foram acima de 0,5 cm, exceto para B7 Bio.

Para todas as misturas estudadas (B5, B7 e B10), o solo adicionado glicerol proporcionou o maior alongamento da raiz de *L. sativa*. Por outro lado, essas mesmas misturas com adição de glicerol produziram as menores quantidades de CO₂. Em suma, podemos observar uma relação entre os resultados dos respirômetros e o alongamento das raízes. Quanto maior a produção de CO₂, menor alongamento das raízes, enquanto menor produção de CO₂ maior alongamento das raízes. Este fato, pode embasar ainda mais a possibilidade de subprodutos da biodegradação inibindo a alongamento da raiz, pois a produção de CO₂ sugere biodegradação e, conseqüentemente, produção de sub-produtos disponíveis para a absorção pelas raízes.

5.4 Teste de fitotoxicidade com lixiviado do solo

As médias de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo das misturas B5 estão apresentados na Figura 10. O lixiviado de todas as misturas B5 estimularam o crescimento quando comparado com o crescimento controle. Os resultados de fitotoxicidade em solo e no lixiviado do solo mostram alguns resultados diferentes para a mistura B5. Por exemplo, as misturas que apresentaram redução no alongamento da raiz no teste de contato direto com o solo foram também as amostras que mais produziram CO₂, porém ao observar a Figura 10 pode-se constatar que as médias de alongamento das raízes são muito similares.

Figura 10 – Média de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo contaminado com a mistura B5 (5 % biodiesel/95 % diesel); B5 Bio (5 % biodiesel/95 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B5 GL (5 % biodiesel/95 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (5 % de biodiesel/95 % diesel e biossurfactante e glicerol). O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio) e controle com adição de glicerol (Controle GL).

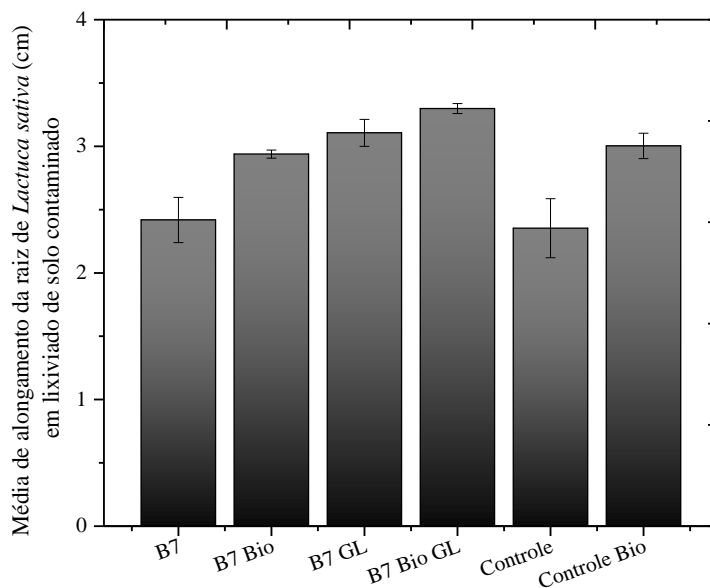


Fonte: elaborada pelo autor.

As médias de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo das misturas B7 estão apresentados na Figura 11. As médias de alongamento da raiz são menores nas amostras B7 e B7 Bio. Embora o alongamento das raízes tenha sofrido redução no lixiviado da amostra B7 e B7 Bio, os valores de alongamento ainda são iguais ou maiores que o controle. Assim, é possível observar que tanto nas misturas B5 como na mistura B7, o alongamento das raízes foi

reduzido em solos no qual a produção de CO₂ foi maior. Porém este fato não ocorreu para os testes com o lixiviado do solo.

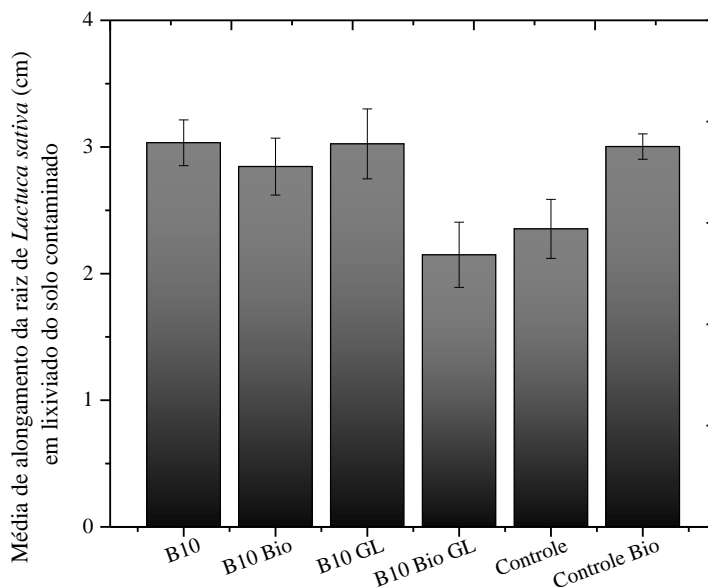
Figura 11 – Média de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo contaminado com a mistura B7 (7 % biodiesel/93 % diesel); B7 Bio (7 % biodiesel/93 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B7 GL (7 % biodiesel/93 % diesel e glicerol); B7 Bio GL (7 % de biodiesel/93 % diesel e biossurfactante e glicerol). O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio).



Fonte: elaborada pelo autor.

As médias de alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo das misturas B10 estão apresentados na Figura 12. As misturas apresentaram, aproximadamente, a mesma média de alongamento, exceto para a amostra B 10 Bio GL, no qual a mistura não estimulou o crescimento da raiz. As médias de alongamento da raiz mostraram resultados diferentes no lixiviado do solo e no teste de contato direto da semente com o solo.

Figura 12 – Média de Alongamento da raiz de *L. sativa* no lixiviado do solo contaminado com a mistura B10 (10 % biodiesel/90 % diesel); B10 Bio (10 % biodiesel/90 % diesel e solução de biossurfactante a 5 %); B10 GL (10 % biodiesel/90 % diesel e glicerol); B5 Bio GL (10 % de biodiesel/90 % diesel e biossurfactante e glicerol). O solo sem contaminação foi utilizado como controle, controle com adição de biossurfactante a 5 % (Controle Bio).



Fonte: elaborada pelo autor.

Os diferentes ensaios com sementes de *L. sativa*, apresentaram grandes diferenças quando as sementes estão em contato direto com o solo e quando em contato com o lixiviado do solo. Esse fato é totalmente compreensível quando trabalhamos com amostras de solo contaminadas com óleos. Ao fazer um lixiviado do solo apenas algumas frações da mistura biodiesel/diesel estarão solúveis em água e acessíveis as raízes. A porção hidrofóbica da mistura estará aglomerada em gotículas e não homogêneo na suspensão do solo. Deste modo, a semente terá maior superfície de contato com a água, o que pode ter aumentado o crescimento da raiz.

Por outro lado, em testes de contato direto com o solo, as sementes estão em contato com a mistura biodiesel/diesel e seus metabólitos provindos da biodegradação. Neste caso, a contato com a água é reduzido, já que a propriedade hidrofóbica da mistura impede o maior contato das raízes com a água e os sais dissolvidos. Neste estudo, os testes com semente em contato direto com o solo contaminado refletiram melhor os resultados de biodegradação dos respirômetros. Os resultados corroboram com Marcato-Romain et al. (2009), os quais indicaram o teste de contato direto para avaliar contaminantes orgânicos no solo.

Comparando os dois tipos de ensaios com sementes é possível observar que a média de alongamento das raízes é muito maior nos ensaios com o lixiviado do solo. No geral, o

alongamento das raízes no lixiviado do solo ficaram entre 2,50 e 3,50 cm, enquanto que as médias de alongamento das raízes em contato direto com o solo não passaram de 1,16 cm.

É importante destacar ainda que tanto os testes de contato direto, quanto os testes com o lixiviado do solo apresentam grande variabilidade como observado também por Boluda et al. (2011).

Esta etapa do estudo indicou que as misturas B7 e B10 foram as que mais produziram CO₂, conseqüentemente, foram as misturas estudadas e abordadas no próximo capítulo. Além disso, a mistura B7 é a mistura utilizada e aprovada pela Lei n° 13.033 e B10 é a mistura prevista para ser aprovada nos próximos anos. Assim, o impacto ambiental dessas misturas que são comercializadas deve ser estudado.

Os resultados deste capítulo foram importantes para embasar os ensaios realizados no próximo capítulo (capítulo 3). No capítulo 3, os ensaios de biodegradação nos respirômetros foram analisados durante 122 dias, para tentar alcançar o período de estabilização, no qual a produção de CO₂ acumulado passa a ser constante. Além disso, foram utilizadas outras concentrações de biossurfactante para detectar os efeitos desse composto na biodegradação.

6 Considerações finais

A mistura B7 produziu maior quantidade de CO₂ e, conseqüentemente, proporcionou o aumento do crescimento microbiano.

A adição do biossurfactante a 5 % não acelerou a biodegradação das misturas.

Após a biodegradação ainda houve fitotoxicidade do solo contaminado.

Os testes de fitotoxicidade com o lixiviado do solo contaminado dificultou a análise de diferenças entre os solos contaminados.

Referências

- ADAMS, G. O.; FUFEYIN, P. T.; OKORO, S. E.; Ehinomen, I. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, v. 3, n. 1, p. 28–39, 2015.
- ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14283 Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola*, v. 62, p. 286-290, 2005.
- AYED, H. B.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUDH, A.; HMIDET, N.; NASRI, M. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 8-14, 2015.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, v. 100, p. 68-70, 1965.
- BEZZA, F. A.; BEUKES, M.; CHIRWA, E. M. N.; Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1911–1922, 2015.
- BP STATISTICAL REVIEWS OF WORLD ENERGY. *Biofuel Production*. 2017. Disponível em: <<http://www.bp.com/en/global/corporate/energy-economics/statistical-review-of-world-energy/renewable-energy/biofuels-production.html>>.
- BRASIL. Decreto nº 76.593, de 14 de novembro de 1975. Institui o Programa Nacional do Álcool e dá outras Providências. Diário Oficial, Brasília, DF, 1975. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1970-1979/decreto-76593-14-novembro-1975-425253-publicacaooriginal-1-pe.html>>.
- BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Diário Oficial, Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm>.
- BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. Diário Oficial, Brasília, DF, 2014. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/lei/113033.htm>.
- BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Diário Oficial, Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/L13263.htm>.
- BOLUDA, R.; ROCA-PÉREZ, L.; MARIMÓN, L. Soil plate bioassay: An effective method to determine ecotoxicological risks. *Chemosphere*, v. 84, p. 1-8, 2011.
- CRUZ, J. M.; LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; TAMADA, I. S.; SILVA, N. M. M. G.; BIDOIA, E. D. Phytotoxicity of soil contaminated with petroleum derivatives and biodiesel. *Ecotoxicology Environmental Contamination*, v. 8, p. 49-54, 2013.

- CRUZ, J. M.; TAMADA, I. S.; LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N. BIDOIA, E. D. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 225, p. 1962-1965, 2014.
- FARIA, A. U.; DE ANGELIS, D. F. Determinação do teor de CO₂ em solução alcalina por condutividade. *Apostila do Departamento de Bioquímica e Microbiologia*. 2014.
- DESAI, D. J.; I. M. BANNAT. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-64, 1997.
- GUARINO, C.; SPADA, V.; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation e assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Chemosphere*, v. 170, p. 10–16, 2017.
- KIM, P.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 138–145, 2010.
- KOSHLAF, E.; SHAHSAVARI, E.; ABURTO-MEDINA, A.; TAHA, M.; HALEYUR, N., MAKADIA, T. H.; MORRISON, P. D.; BALL, A. S. Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v 133, p. 297–305, 2016.
- KOSTKA, J. E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W. A.; GREEN, S. J.; FREYER, J.; CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T. C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico Beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 7962-7974, 2011.
- LAHEL, A.; BELAY, A.; SERGIENKO, N.; SHAKYA, M.; BEHERA, S.; RENE, E. R.; PARK, H.; ESTEFANÍA, M. L. Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 113, p. 375-385, 2016.
- MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; DE OLIVEIRA, L. M.; CONTIERO, J.; DE ANGELIS, D. F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1323-1328, 2008.
- MARCATO-ROMAIN, C. E.; GUIRESSE, M.; CECCHI, M.; COTELLE, S.; PINELLI, E. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere*, v. 77, p. 345-350, 2009.
- MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, v. 37, n. 8, p. 1362–1375, 2011.
- MEYER, D. D.; BEKER, S. A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M. DO C. R.; FRAZZON, A. P. G.; OSTI, J. F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. DE O.; BENTO, F.M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 95, p. 356–363, 2014.
- MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfactantes. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. p. 10.

- NG, Y. F., GE, L., CHAN, W. K., TAN, S. N., YONG, J. W. H., TAN, T. T. Y. An environmentally friendly approach to treat oil spill: Investigating the biodegradation of petrodiesel in the presence of different biodiesels. *Fuel*, v. 139, p. 523–528, 2015.
- NUNES-HALLDORSON, V. S.; STEINER, R. L.; SMITH, G. B. Residual toxicity after biodegradation: interactions among benzene, toluene, and chloroform. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 57, p. 162–167, 2004.
- PANNU, J. K.; SINGH, A.; WARD, O. P. Influence of peanut oil on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 513, p. 508-513, 2003.
- PLAZA, G. A.; JANGID, K.; LUKASIK, K.; NALECZ-JAWECKI, G.; BERRY, C. J.; BRIGMON, R. L. Reduction of petroleum hydrocarbons and toxicity in refinery wastewater by bioremediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 81, p. 329-333, 2008.
- PLAZA, G. A.; TUREK, A.; KRÓL, E.; SZCYGŁOWSKA, R. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, p. 3165-3170, 2013.
- POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, L. F. A.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v. 35, p. 5393–5398, 2007.
- SHOEMAKER, H. E.; Mc LEAN E. O.; PRATT, P. F. Buffer methods for determining lime requirement of soil with appreciable amounts of extractable aluminium. *Soil Science Society of America Proceedings*, v. 25, p. 274-277, 1961.
- SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: the charge and the bond of the fuel producing. *Ciência Rural*, v. 38, p. 843-851, 2008.
- SØRENSEN, G.; PEDERSEN, D. V.; NØRGAARD, A. K.; SØRENSEN, K. B.; NYGAARD, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresources Technology*, v. 102, p. 5259–5264, 2011.
- SORIANO, A. U.; MARTINS, L. F.; VENTURA, E. S. A.; DE LANDA, F. H. T. G.; VALONI, É.A.; FARIA, F. R. D.; FERREIRA, R. F.; FALLER, M. C. K.; VALÉRIO, R. R.; LEITE, D. C. A.; DO CARMO, F. L.; PEIXOTO, R. S. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 102–114, 2015.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L). In: MORALES, G.C. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Mexico: IMTA, 2004. p. 142.
- STROTMANN, U.; REUSCHENBACH, P.; SCHWARZ, H.; PAGGA, U. Development and evaluation of an online CO₂ evolution test and a multicomponent biodegradation test system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 4621–4628, 2004.
- SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 128–133, 2015.
- TAM, N. F. Y.; TIQUIA, S. M. Assessing toxicity of ‘spent sawdust pig-litter’ using seed germination technique. *Resource Conservation Recycling*, v.11, p.261-274, 1994.

TAMADA, I. S.; LOPES, R. P. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. Biodegradation and toxicological evaluation of lubricant oils. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, p. 951-956, 2012.

TÓTH, J. Sorption of light hydrocarbons on clays from the Oligocene Kiscell Clay Formation, Hungary. *Mineralogia*, v. 52, p. 43-51, 2009.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R., DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, v. 22, p. 231-241, 2011.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, p.1163-1172, 2001.

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

YASSINE, M. H.; WU, S.; SUIDAN, M. T.; VENOSAS, A. D. Aerobic biodegradation kinetics and mineralization of six petrodiesel/soybean-biodiesel blends. *Environmental Science & Technology*, v. 47, p. 4619-4627, 2013.

*BIODEGRADAÇÃO DE MISTURAS DE DIESEL/BIODIESEL NO SOLO COM ADIÇÃO DE
BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES*

1 Introdução

A contaminação ambiental por derivados do petróleo pode impactar o ambiente de forma severa e persistente. A persistência e a fonte não-renovável de derivados do petróleo fizeram com que a busca por fontes alternativas de combustíveis fosse intensificada e alvo atual de discussões (FISHER et al., 2008). Neste contexto, surgem os biocombustíveis, moléculas capazes de reduzir a dependência mundial em combustíveis de origem fóssil. Embora os biocombustíveis sejam uma realidade nos dias de hoje, o consumo dessas substâncias, na maioria das vezes, é feito em combinação com combustíveis derivados de petróleo, como por exemplo o álcool misturado à gasolina e o biodiesel misturado ao óleo diesel (BRASIL, 2014). Sendo assim, grande parte das misturas ainda são de combustíveis de origem do petróleo. Essa mistura de combustíveis de origens diferentes pode alterar completamente o modo de biodegradação dessas substâncias no ambiente (SORIANO et al., 2015; SØRENSEN et al., 2011).

No contexto de biodegradação de combustíveis fósseis, os biosurfactantes apresentam propriedades, tais como redução da tensão superficial e poder de emulsificação, que permite que essas substâncias atuem ativamente na disponibilidade dos contaminantes orgânicos para os micro-organismos, durante processo de biodegradação (BEZZA et al., 2015; ŁAWNICZAK et al., 2013). No entanto, o sucesso do processo de biodegradação de qualquer substância ou molécula está inteiramente relacionado ao potencial dos micro-organismos em metabolizá-las. O processo de biodegradação de compostos complexos, como os combustíveis fósseis e compostos intermediários produzidos durante o processo de biodegradação, exige uma comunidade microbiana com ampla capacidade enzimática para utilizar diferentes substâncias (YERGEAU et al., 2012).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a biodegradação de misturas B7 e B10 em solo, utilizando diferentes concentrações de biossurfactantes e também avaliar a biodegradação do biodiesel (B100) e do diesel (D100).

2.2 Objetivos específicos

- Comparar a biodegradação das misturas diesel/biodiesel por respirômetros, bem como das substâncias puras.
- Avaliar o efeito do biossurfactante em concentrações de 8 % e 10 %.
- Avaliar a comunidade microbiana, por contagem de UFC, em 30, 60 e 122 dias de incubação do solo contaminado.
- Avaliar o pH do solo, após 122 dias de incubação do solo contaminado.
- Comparar a fitotoxicidade por contato direto dos solos contaminados, após 122 dias de incubação.
- Avaliar os metabólitos produzidos durante a biodegradação do biodiesel.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Biodegradação de diesel e de misturas diesel/biodiesel

A biorremediação é uma técnica de descontaminação ambiental de áreas impactadas através da ação, principalmente, de micro-organismos com capacidades metabólicas variadas para degradar moléculas orgânicas complexas. Estratégias de biorremediação têm como objetivo acelerar a biodegradação do composto e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade. A bioaugmentação é uma estratégia de biorremediação que aumenta a capacidade de biodegradação do solo pela adição de micro-organismos com alto potencial para biodegradar o contaminante (COLLA et al., 2014). Também, a bioestimulação, que é a adição de nutrientes necessários para o bom desenvolvimento da microbiota do solo, pode acelerar muito a biodegradação (TYAGI et al., 2011).

A biodegradação dos alcanos que compõem o óleo diesel podem ocorrer sob condições aeróbias e anaeróbias. Sob condições aeróbias, a biodegradação de alcanos é iniciada por oxigenases, a qual introduz um átomo de oxigênio no grupo metil da molécula de alcano, produzindo um álcool primário, o qual é oxidado pelas enzimas álcool desidrogenase. Posteriormente, ocorre a clivagem da molécula de alcano na região entre o segundo e o terceiro carbono da cadeia por β -clivagem (JI et al., 2013; SHAHIMIN et al., 2016).

Devido a persistência dos derivados de petróleo no ambiente, a busca por fontes alternativas de combustíveis trouxe à tona discussões sobre o impacto ambiental e econômico da produção de biocombustíveis (JOHNSON et al., 2016; SALADINI et al., 2016; HALLENBECK et al., 2016; TABATABAEI et al., 2015; BRENNAN e OWENDE, 2010; HILL et al., 2006).

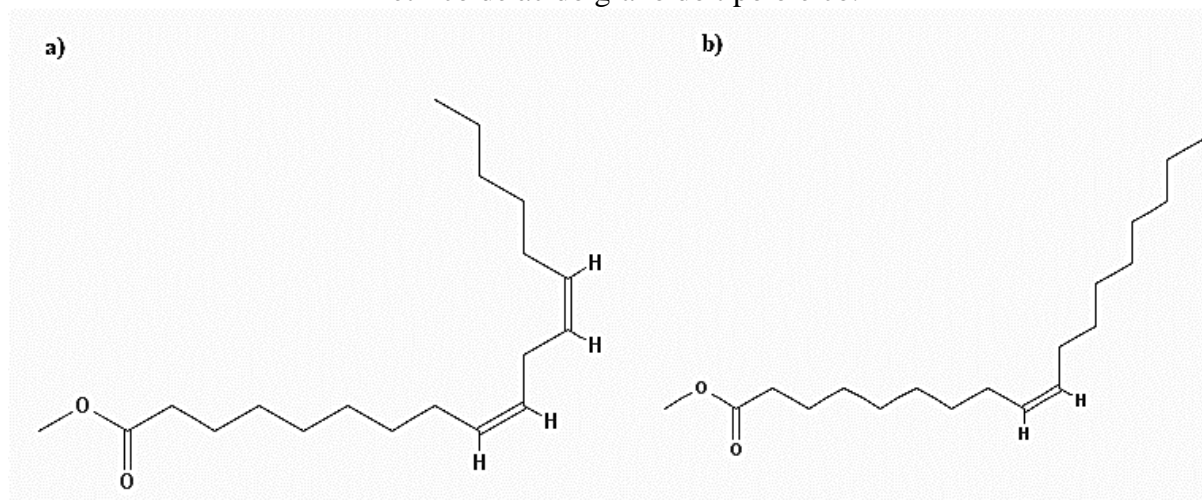
O biodiesel é produzido pela reação de transesterificação, na qual os triglicerídeos reagem com um álcool produzindo o biodiesel e o glicerol como resíduo. No Brasil, o metanol é o álcool utilizado para o processo de transesterificação e adicionado em excesso para permitir o máximo de rendimento na produção do biodiesel. Posteriormente, esse metanol em excesso é retirado, pois o biodiesel não pode ser comercializado com concentrações de metanol residual acima de, 0,2 % m/m, segundo parâmetros internacionais estabelecidos por ASTM D6751-09 (ASTM, 2009) e EN 14214 (EN, 2010). Além das concentrações de metanol, as normas ASTM D6751-09 e EN 14214 também estabelecem outros parâmetros para que o biodiesel produzido

em diferentes países mantenha características similares quanto a composição. Essa padronização é muito importante para viabilizar a comercialização e utilização do biodiesel.

A composição dos ácidos graxos metílicos que constituem o biodiesel varia dependendo da matéria-prima utilizada para a produção. O biodiesel (fatty acid methyl ester - FAME) produzido a partir da soja é composto, principalmente, por éster metílico de ácido graxo do tipo linoleico [18:2] (54 % wt) e oleico [18:1] (24 % wt) com estruturas químicas apresentadas na Figura 1 (MOSER, 2009). Por outro lado, o biodiesel de origem animal é composto principalmente de éster metílico de ácido graxo do tipo esteárico (34,7 %), oleico (29,8 %) e palmítico (25,3 %) (DA CUNHA et al., 2009).

A biodegradação do biodiesel começa com a clivagem do grupo metil éster por uma esterase, produzindo uma molécula de ácido graxo e uma molécula de álcool. Posteriormente, os ácidos graxos são oxidados via β -oxidação e degradados a ácido acético e uma molécula de ácido graxo de cadeia carbônica menor (SOUSA et al., 2007; THOMAS et al., 2017).

Figura 1 - Estrutura química do éster metílico de ácido graxo do tipo linoleico (a) e éster metílico de ácido graxo do tipo oleico.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> acesso 20 de julho de 2016

O biodiesel é misturado ao óleo diesel em qualquer proporção. Atualmente, no Brasil, todo o óleo diesel comercializado em território nacional possui um percentual de 7 % de biodiesel misturado ao óleo diesel (BRASIL, 2014). Essa mistura de biodiesel-diesel muda as características de ambos os componentes e torna a mistura diferente dos óleos que a compõem. Por isso, a microbiota responsável pela biodegradação desta mistura também pode ser alterada, dependendo da quantidade de biodiesel na mistura (SORIANO et al., 2015; SØRENSEN et al., 2011). A adição de biocidas aos biocombustíveis não é praticada no Brasil, nem mesmo em

caso de contaminações de tanque, ao contrário dos EUA, que indicam a utilização de biocidas nessa situação (BUCKER, 2009).

3.2 Aplicação de biossurfactante em solo contaminado por hidrocarbonetos

Os biossurfactantes são moléculas com uma parte hidrofóbica composta por uma longa cadeia de ácido graxo ou hidróxi-ácido graxo e uma porção hidrofílica, que pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool. De acordo com a composição química do biossurfactante, é possível classificar em diferentes tipos, como por exemplo os glicolipídeos produzidos por *Arthrobacter* sp., os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, os fosfolipídeos produzidos por *Acinetobacter* spp, os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, compostos particulados produzidos por *Pseudomonas marginalis*, dentre outros (PEREIRA et al., 2013; MULLIGAN, 2005).

Bezza et al. (2015) estudaram o efeito da aplicação do biossurfactante do tipo lipopeptídeo na biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo. Os autores observaram que a aplicação do biossurfactante permitiu a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, substâncias conhecidas pela persistência no ambiente. Alvarez et al. (2015) sugerem que a surfactina seja usada na recuperação de ambientes contaminados por petróleo, devido à alta atividade emulsificante e a habilidade de reduzir a tensão superficial e interfacial. Os ramnolipídeos também são um tipo de biossurfactante capaz de melhorar a biodegradação de hidrocarbonetos (MARIAAMALRAJ et al., 2016). Chrzanowski et al. (2012) relatou que a adição de ramnolipídeos estimulou a biodegradação de uma mistura B20 (20 % de biodiesel e 80 % de diesel), em aproximadamente 50 % após 7 dias, seguido pelo aumento da dissipação dos constituintes do óleo diesel. Em 5 dias, todo o biodiesel da mistura já havia sido biodegradado. Por outro lado, o ramnolípideo não melhorou a biodegradação do diesel puro.

4 Material e métodos

4.1 Respirômetria

As características físico-químicas do solo utilizado nos respirômetros (BARTHA e PRAMER, 1965) no início dos testes de biodegradação estão relacionadas na Tabela 1. Trata-se de um solo arenoso com pouca matéria orgânica e pH 5, ou seja, na faixa ácida de pH.

Tabela 1 - Composição físico-química do solo utilizado nos respirômetros.

Composição físico-química	
pH CaCl ₂ *	5
Areia Total	679 g kg ⁻¹
Cobre (DTPA) **	2,3 mg. dm ³
Matéria orgânica (M.O.)	21 g.dm. ³
Ferro (DTPA)	24 mg.dm. ³
P (Resina)	32 mg.dm. ³
Silte	92 g kg ⁻¹
Manganês (DTPA)	44,5 mg.dm. ³
S (Fosfato de cálcio 0,01 mol L ¹)	<4 mg.dm. ³
K (Resina)	1,1 mmolc.dm ³
Zn (DTPA)	1 mg.dm ³
Ca (Resina)	21 mmolc.dm ³
Argila (c/ dispersão) ***	300 g kg ⁻¹
Mg (Resina)	6 mmolc.dm ³
H+Al (SMP) ****	25 mmolc.dm ³

* CaCl₂ para medir o pH, minimiza os efeitos dos sais do solo nas medidas de pH. **Método DTPA, utiliza a solução de ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA) para extração de micronutrientes. ***Método para determinação da textura do solo separa frações de areia, silte e argila utilizando dispersão mecânica e dispersante químico, as partículas maiores que 50 µm são separados por peneiramento e a separação da argila e silte por sedimentação diferencial. ****Método SMP, acrônimo de Shoemaker, Mc Lean e Pratt, é um método utilizado na avaliação da acidez potencial (SHOEMAKER et al., 1961).

A montagem dos respirômetros seguiu metodologia descrita pela NBR 14283 (ABNT, 1999) com adaptações. O solo utilizado nos respirômetros foi peneirado em malha de granulometria maior ou igual a 1,5-2,0 mm. A umidade natural do solo foi calculada pesando o solo em balança analítica ADA 210/L antes e após secagem em estufa a 105 °C. Os respirômetros foram montados em triplicatas, cada respirômetro continha 50,0 g de solo peneirado e pesado em balança Shimadzu BL3200H. Também, foram adicionados 5,0 mL da mistura biodiesel/diesel.

As misturas de biodiesel e diesel foram feitas nas seguintes proporções em v/v: **B7** (Biodiesel 7 %/93 % Diesel); **B10** (Biodiesel 10 %/90 % Diesel). O solo contaminado com

B100, continha biodiesel puro e o solo contaminado com **D100**, continha óleo diesel puro. Na Tabela 2 está descrito as quantidades da mistura biodiesel/diesel e a quantidade de solução de biossurfactante bruto no solo dos respirômetros. A solução de biossurfactante adicionada ao solo foi preparada a 8 % e 10 %. O biossurfactante bruto, ou seja, sem purificação, foi diluído em tampão fosfato pH 7. Os respirômetros foram acondicionados em incubadora BOD Solab SL-224 a 28°C por 122 dias.

Tabela 2 - Mistura de biodiesel/diesel e biossurfactante nos ensaios respirométricos.

Ensaio	Contaminante (mL)	Biossurfactante (mL)	Água (mL)
B100	5,0	--	5,0
D100	5,0	--	5,0
D100 + biossurfactante 10 %	5,0	5,0	--
B7	5,0	--	5,0
B7+ Biossurfactante 8 %	5,0	5,0	--
B7+ biossurfactante 10 %	5,0	5,0	--
B10	5,0	--	5,0
B10+Biossurfactante 8 %	5,0	5,0	--
B10+biossurfactante 10 %	5,0	5,0	--
Solo (controle)	--	--	10,0
Solo + biossurfactante 8 %	--	5,0	5,0
Solo + biossurfactante 10 %	--	5,0	5,0

4.2 Medidas da produção de CO₂ por condutividade

A solução de KOH 0,4 M foi preparada com hidróxido de potássio (P.A. Synth) e água desionizada livre de CO₂. Para padronizar a solução de KOH 0,4 M, foi utilizada solução de biftalato de potássio C₈H₅KO₄ (P.A. Synth) de massa conhecida e 2 gotas de fenolftaleína como indicador. A solução de biftalato também foi preparada com água desionizada livre de CO₂. A solução de KOH dos respirômetros foram medidas em condutivímetro Tecnpon CA150, em intervalo de tempo pré-determinados.

4.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os solos dos respirômetros foram utilizados para contagem de UFC do solo. Para realizar a contagem, 1,0 g de cada amostra de solo foi colocada em 9,0 mL de solução salina de NaCl 0,85 %. A suspensão foi então agitada em vortex por 1 min. Após agitação, 1,0 mL da solução foi retirada para ser utilizada na diluição seriada. O plaqueamento foi realizado pela técnica de *pour plate*. O meio *plate count agar* da Difco foi utilizado para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas e o meio Sabouraud da Acumedia foi utilizado para

contagem de fungos (DIFCO, 1984). Os meios foram esterilizados em autoclave e, posteriormente, mantidos a 45 °C até a utilização. Foi adicionado cloranfenicol levogiro (P. A. Inlab) no meio Sabouraud, para inibir o crescimento de bactérias. O plaqueamento foi realizado a 30, 60 e 120 dias de incubação do solo.

4.4 Medidas de pH do solo após biodegradação

O solo dos respirômetros foram submetidos a medidas de pH após 122 dias de incubação. Foram pesados 10,0 g de solo do respirômetro em um erlenmeyer de 50,0 mL e adicionados 25,0 mL de solução de cloreto de cálcio a 0,01 mol L⁻¹ (CaCl₂ marca Dinâmica). Os erlenmeyers foram agitados em vortex Phoenix AP 56 por 1 min e deixados descansar por 1 h. Posteriormente, foi medido o pH do sobrenadante em pHmetro da Digimed.

O uso de cloreto de cálcio para medir o pH é a metodologia padrão para minimizar os efeitos dos sais do solo nas medidas de pH (KALRA, 1995). Esses sais são naturalmente variáveis devido a sazonalidade.

4.5 Teste fitotoxicidade com sementes após biodegradação

Os solos dos sistemas respirométricos foram submetidos ao teste de fitotoxicidade com sementes de *Cucumis sativus* e *Lactuca sativa* da marca Isla® sem adição de fungicida, seguindo metodologia descrita por Cruz et al. (2014). O solo foi distribuído uniformemente em placas de Petri e umidificadas com 3,0 mL de água desionizada. Em cada placa foram colocadas 15 sementes. Os testes foram mantidos em incubadora BOD Solab SL-224 a 22 °C±1 por 120 h. Foram medidas o alongamento da raiz e calculado a média de alongamento e o desvio médio da amostra em cada tratamento e no controle.

4.6 Monitoramento do solo contaminado com biodiesel durante 50 dias

Os solos foram contaminados com biodiesel (B100) e, também, foram feitas amostras de solo contaminado com B100 adicionadas soluções para corrigir o pH durante processo de biodegradação. Foi adicionado 0,5 g de cal sodada (mistura de CaO e NaOH) da marca Dinâmica, em 50,0 g de solo (proporção de 1:100). Durante o processo de biodegradação foram retirados, aproximadamente, 10,0 g de solo dos frascos e colocados em erlenmeyer de 50,0 mL,

posteriormente, foi adicionado 25,0 mL de solução de cloreto de cálcio a 0,01 mol L⁻¹. Os erlenmeyers foram agitados em vortex por 1 min e deixados descansar por 1 h. Posteriormente, foi medido o pH do sobrenadante em pHmetro da Digimed e a condutividade.

O teste de fitotoxicidade do solo contaminado com biodiesel foi realizado com sementes de *C. sativus*, seguindo metodologia descrita no item 4.5 deste capítulo. O monitoramento de UFC do solo foi realizado em 10, 30 e 50 dias de biodegradação do solo contaminado com biodiesel, seguindo a metodologia descrita no item 4.3 deste capítulo

4.7 Análise do solo contaminado com biodiesel por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).

O método utilizado para análise do solo contaminado com biodiesel foi empregado com o objetivo de detectar o metanol, como metabólito da biodegradação do biodiesel (DA CRUZ et al., 2012; THOMAS et al., 2017). O GC/MS Shimadzu QP2010 Ultra foi equipado com uma coluna Rtx-5MS (5 % fenil, 95 % dimetilpolissiloxano) marca Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e um linear com diâmetro interno de 0,75 mm, especial para injeção da amostra por *headspace*. As condições cromatográficas de análise do metanol foram: temperatura da coluna: 40 °C, temperatura de injeção: 160 °C, modo de injeção: split, Fluxo: linear, velocidade de pressão: 33,6 kPa, fluxo total: 31,6 mL/min fluxo da coluna: 0,80 mL/min, velocidade linear: 32,3 cm/seg, fluxo: 1,0 mL/min, taxa de split: 37,2. A rampa de temperatura iniciou-se em 40 °C por 1 min, subindo a taxa de 5 °C para 70 °C por 1 min e por fim aumentando a temperatura a uma taxa de 10 °C para 100 °C por 30 seg.

Para a detecção por espectrometria de massas, utilizou-se um detector contendo uma fonte de ionização por elétrons (EI-70 eV) e um analisador de massas quadrupolo, operado no modo varredura (SCAN) para identificação e no modo “Total Ion Current” (TIC), para quantificação dos compostos. A interface foi mantida a 250 °C e a fonte de íons a 200 °C.

A resposta do equipamento foi analisada com o auxílio do software Lab Solutions-GCMS Solution, pelo qual foi possível a quantificação dos compostos de acordo com o a biblioteca de espectros disponível no software NIST11 Mass Spectral Library EPA/NIH. Para a coleta da fase gasosa, foi utilizada uma seringa de vidro de 100 uL Hamilton Gastight, própria para injeção de amostras na fase gasosa.

O solo contaminado foi acondicionado em frascos de vidro de 20,0 mL com tampa de borracha e vedados com lacre de alumínio para impedir o vazamento do metanol na fase gasosa.

Posteriormente, o vidro lacrado contendo 2,0 g de solo contaminado foi colocado em banho-Maria Nova Ética modelo 316/3 a 60 °C por 15 min. Após esse período, o lacre foi retirado e a seringa foi introduzida no frasco, furando a tampa de borracha para retirar a fase gasosa e injetada no GC/MS.

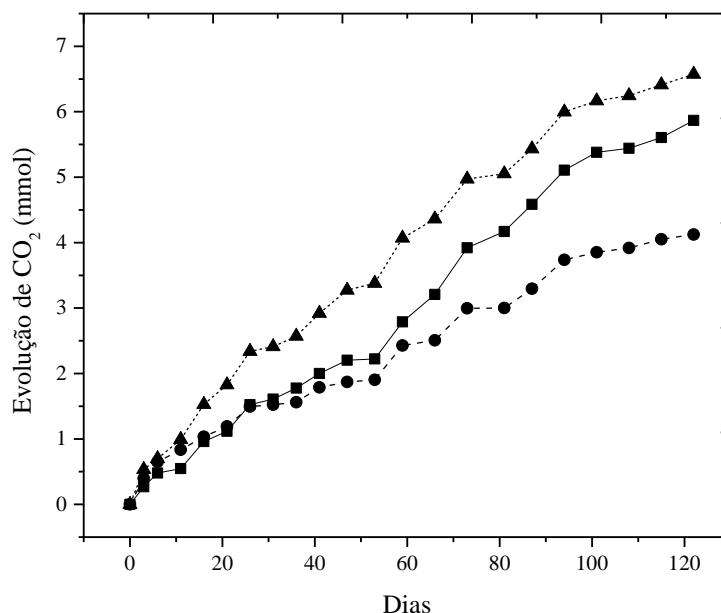
A construção da curva de calibração seguiu o mesmo método utilizado para a detecção de metanol nas amostras. Foram feitas concentrações de 0, 0,25, 0,5, 10,0 e 12,5 mg mL⁻¹ com metanol P.A. A equação linear resultante foi utilizada para o cálculo de produção de metanol na amostra.

5 Resultados e discussão

5.1 Respirômetria do solo “in natura” (sem contaminação)

A produção acumulada de CO₂ do solo controle (sem nenhuma contaminação) está apresentada na Figura 2. A adição da solução de biossurfactante a 10 % elevou a produção de CO₂ em 12 %, em relação ao solo controle. Por outro lado, a adição da solução de biossurfactante a 8 % reduziu a produção de CO₂ para 181 mg de CO₂.

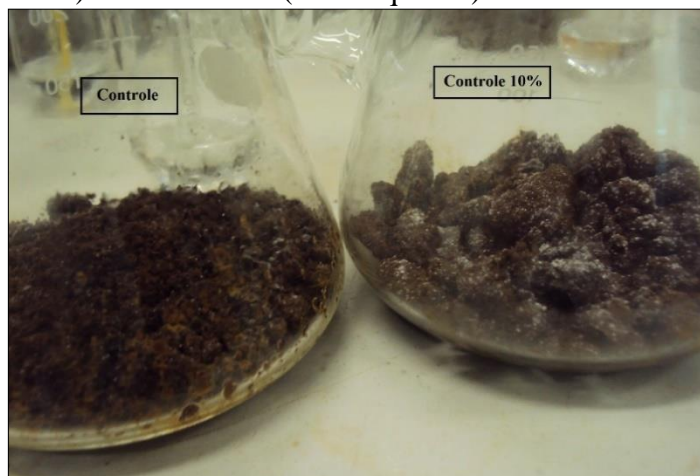
Figura 2 - Produção de CO₂ acumulada durante 122 dias no solo controle (—■—), solo controle adicionado biossurfactante a 8 % (---●---), solo controle adicionado biossurfactante a 10 % (···▲···).



Fonte: elaborada pelo autor.

O solo controle, em que foi adicionado biossurfactante a 10 %, apresentou um grande crescimento de fungos, que pode ser observado na Figura 3. Esse grande crescimento fúngico pode ter elevado a respiração do solo para valores superiores ao controle. Assim, este resultado permite sugerir que a adição da solução de biossurfactante não teve ação fungicida no solo, que é um fato descrito em alguns trabalhos na literatura (PLAZA et al., 2013).

Figura 3 - Crescimento de fungos no solo controle 10 % (com adição de solução de biossurfactante a 10 %). Solo controle (lado esquerdo) e solo controle 10 % (lado direito).



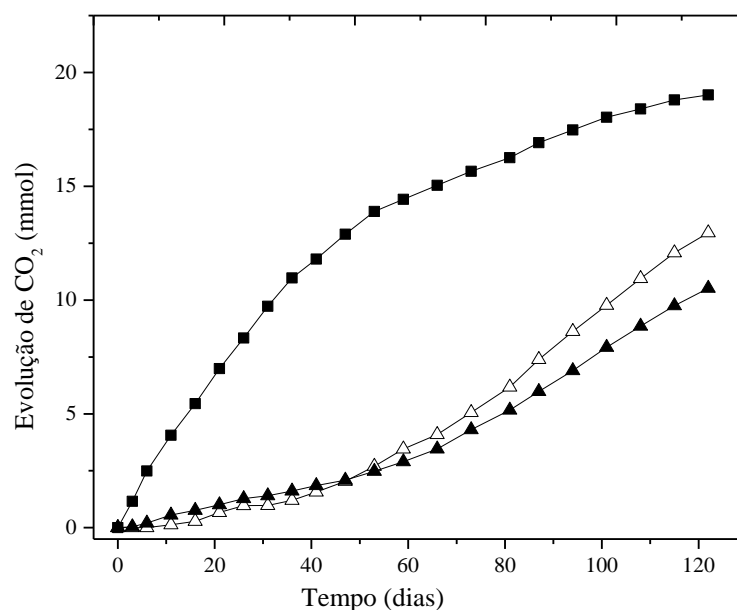
Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Respirômetria do solo contaminado com biodiesel e diesel

A produção de CO_2 referente ao solo contaminado está representada nas Figuras 4, 6 e 8. Os valores de produção de CO_2 para os contaminantes já foram subtraídos dos valores do controle, deste modo nos gráficos estão apenas a produção de CO_2 do contaminante.

Na Figura 4 está registrada a produção de CO_2 acumulada provenientes do solo contaminado com B100 (biodiesel 100 %), D100 (diesel 100 %) e D100 10 % (diesel 100 % adicionado solução de biossurfactante a 10 %). A produção de CO_2 foi intensa nos primeiros dias de biodegradação do biodiesel e alcançou estabilidade, após 60 dias de biodegradação. Ao final de 122 dias de incubação, o solo contaminado com biodiesel produziu 19 mmol de CO_2 . Por outro lado, a produção de CO_2 para o solo contaminado com diesel foi de apenas 12 mmol após 122 dias. A biodegradação do diesel foi mais intensa após 45 dias, sugerindo que a microbiota precisa de uma fase de adaptação maior (fase “lag”) para selecionar microorganismos eficientes na biodegradação do óleo diesel. A adição de biossurfactante a 10 % não favoreceu a biodegradação do diesel, no qual foram produzidos apenas 10 mmol de CO_2 ao final de 122 dias.

Figura 4 - Produção de CO₂ acumulada durante 122 dias no solo contaminado com biodiesel puro (—■—), solo contaminado com óleo diesel puro (—△—), solo contaminado com diesel adicionado biossurfactante a 10 % (—▲—).

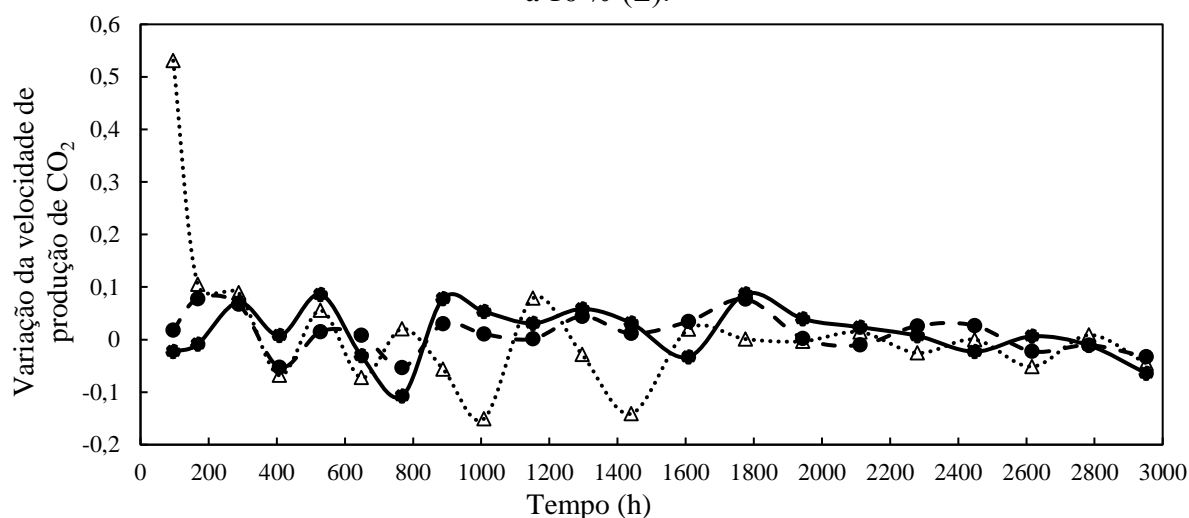


Fonte: elaborada pelo autor.

A concentração inicial de diesel no solo também afeta a biodegradação, grandes quantidades de diesel adicionada ao solo pode causar forte toxicidade para os micro-organismos e impede a adaptação de micro-organismos com potencial para biodegradação (SIDDIQUI et al., 2001). No presente estudo a porcentagem de adição de diesel no solo foi de 8,1 % m/m, concentração que torna difícil a biodegradação, mesmo após 122 dias de incubação. Siddiqui et al. (2001) mostraram que concentrações de 4 % e 13,6 % de diesel adicionada ao solo apresenta uma redução de alcanos de apenas 9 % e <1 %, respectivamente, mesmo após 150 dias de biodegradação.

A Figura 5 apresenta a variação da velocidade de produção de CO₂ do solo contaminado com as misturas B100 (biodiesel puro), durante os 122 dias de biodegradação. As maiores velocidades de produção de CO₂ foram registradas nas primeiras 200 horas (\pm 8 dias). Pode-se notar que a velocidade de produção de CO₂ no solo contaminado com biodiesel foi alta logo no início das medidas. No entanto, após 1400 h (\pm 58 dias) a velocidade de produção de CO₂ caiu e manteve-se até o final dos 122 dias. Foi possível observar também que após 60 dias a produção de CO₂ no solo contaminado com biodiesel começou a estabilizar, ou seja, baixa produção de CO₂ (Figura 5). Portanto, a redução da velocidade de produção de CO₂ e a estabilização da produção CO₂ sugerem que a biodegradação de biodiesel ocorre nos primeiros 60 dias de biodegradação.

Figura 5 - Variação da velocidade de produção de CO₂ no solo contaminado com biodiesel (Δ), com diesel (●) e solo contaminado com óleo diesel adicionado solução de biossurfactante a 10 % (■).



Fonte: elaborada pelo autor.

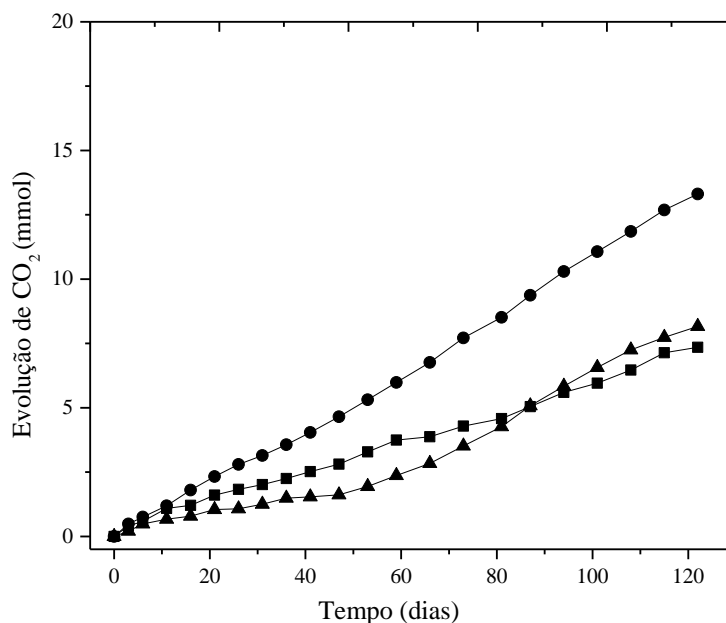
A variação da velocidade de produção de CO₂ do solo contaminado com óleo diesel é estável. Houve uma pequena variação nas primeiras 800 h (± 34 dias), mas depois desse período a variação da velocidade de produção de CO₂ foi estável durante todo o restante do tempo. Essa variação nos primeiros 34 dias pode estar relacionada à fase de adaptação, pois é a partir desse momento que a produção de CO₂ começa a aumentar no solo contaminado com óleo diesel.

5.3 Respirômetria do solo contaminado com misturas de biodiesel e diesel adicionado biossurfactante em diferentes concentrações

A Figura 6 mostra a produção de CO₂ acumulada no solo contaminado com as misturas B7, B7 8 % (adicionado biossurfactante a 8 %) e o solo contaminado com a mistura B7 10 % (que foi adicionado biossurfactante a 10 %).

O solo contaminado com a mistura B7 produziu 7,35 mmol de CO₂ durante 122 dias de biodegradação. O solo contaminado com a mistura B7 8 % elevou a produção de CO₂ para 13,30 mmol de CO₂ acumulado durante 122 dias. Esta produção corresponde a um aumento de 80 % de CO₂ acumulado, em relação a mistura B7 sem adição de biossurfactante. Por outro lado, a adição de biossurfactante a 10 % na mistura (B7 10 %) não elevou a produção de CO₂, quando comparado com o solo contaminado com a mistura B7 sem biossurfactante. Para a mistura B7 10 % a produção de CO₂ acumulada foi de 8,16 mmol.

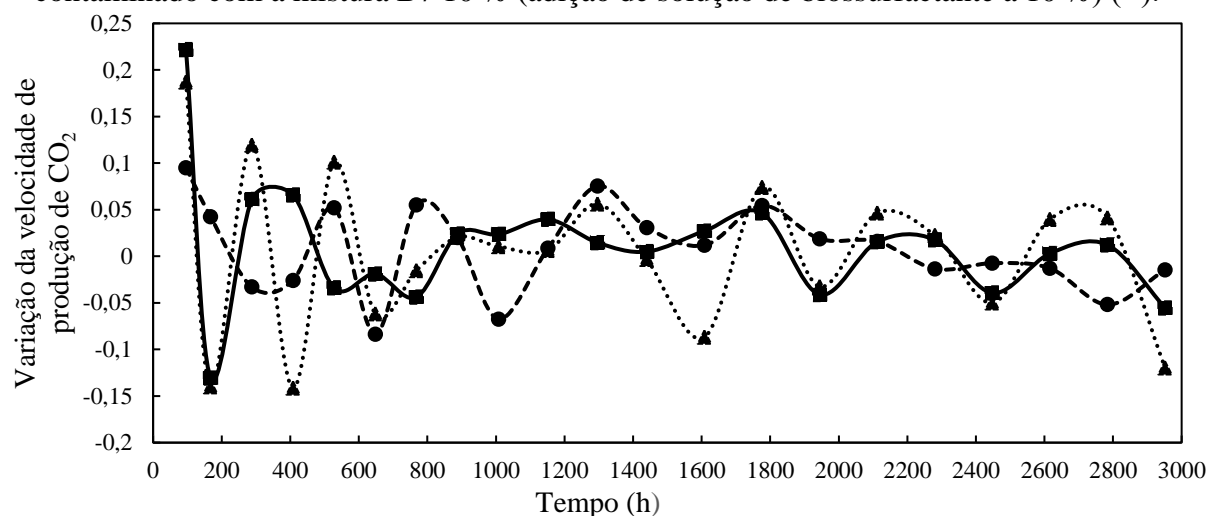
Figura 6 - Produção de CO₂ acumulada durante 122 dias no solo contaminado com misturas, B7 (7 % biodiesel/93 % diesel) (—■—), B7 8 % (adicionado biossurfactante a 8 %) (---●---), B7 10 % (adicionado biossurfactante a 10 %) (··▲··).



Fonte: elaborada pelo autor.

A Figura 7 apresenta a variação da velocidade de produção de CO₂ do solo contaminado com as misturas B7 (mistura na proporção de 7 % biodiesel/93 % diesel), durante os 122 dias de biodegradação. As maiores variações de velocidades de produção de CO₂ foram registradas nas primeiras 500 horas (± 20 dias). Comparando a produção de CO₂ do solo contaminado com diesel, foi possível observar que a adição de 7 % de biodiesel na mistura intensificou a produção de CO₂, porém no final de 122 dias a produção acumulada de CO₂ para as misturas B7 e B7 10 % foi abaixo da produção acumulada de CO₂ no solo contaminado com óleo diesel. Assim, a adição de 7 % de biodiesel no diesel para compor a mistura B7 não teve efeito em termos de aumento da atividade microbiana do solo.

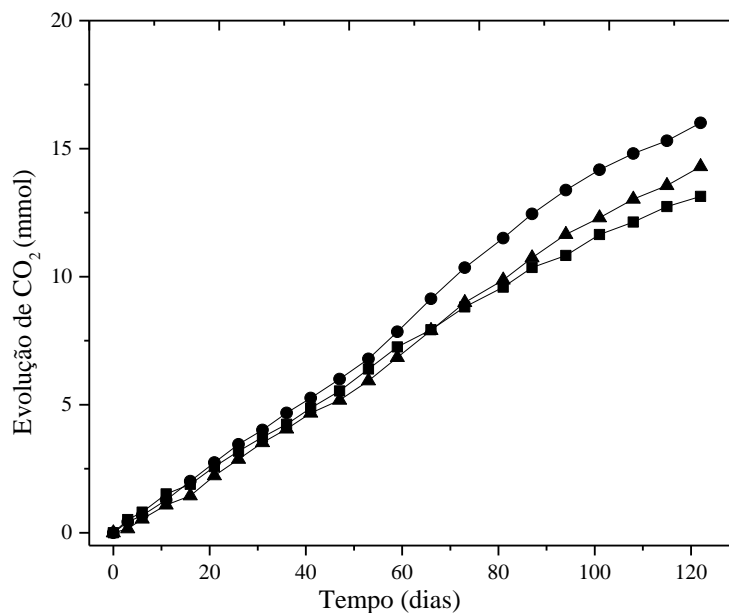
Figura 7 - Variação da velocidade de produção de CO₂ no solo contaminado com mistura B7 (▲), com a mistura B7 8 % (adição de solução de biossurfactante a 8 %) (■) e solo contaminado com a mistura B7 10 % (adição de solução de biossurfactante a 10 %) (●).



Fonte: elaborada pelo autor.

A Figura 8 mostra a produção de CO₂ acumulada no solo contaminado com as misturas B10 (10 % biodiesel/90 % diesel), B10 8 % (adicionado biossurfactante a 8 %) e B10 10 % (adicionado biossurfactante a 10 %). Os solos contaminados com as misturas B10, B10 8 % e B10 10 % apresentaram valores aproximados de produção de CO₂ acumulada, 13,13 mmol, 16,00 mmol e 14,29 mmol, respectivamente. Embora os valores de produção de CO₂ acumulados foram próximos, pode-se observar que a adição de biossurfactante a 8 % também elevou um pouco a produção de CO₂, como observado para a mistura B7.

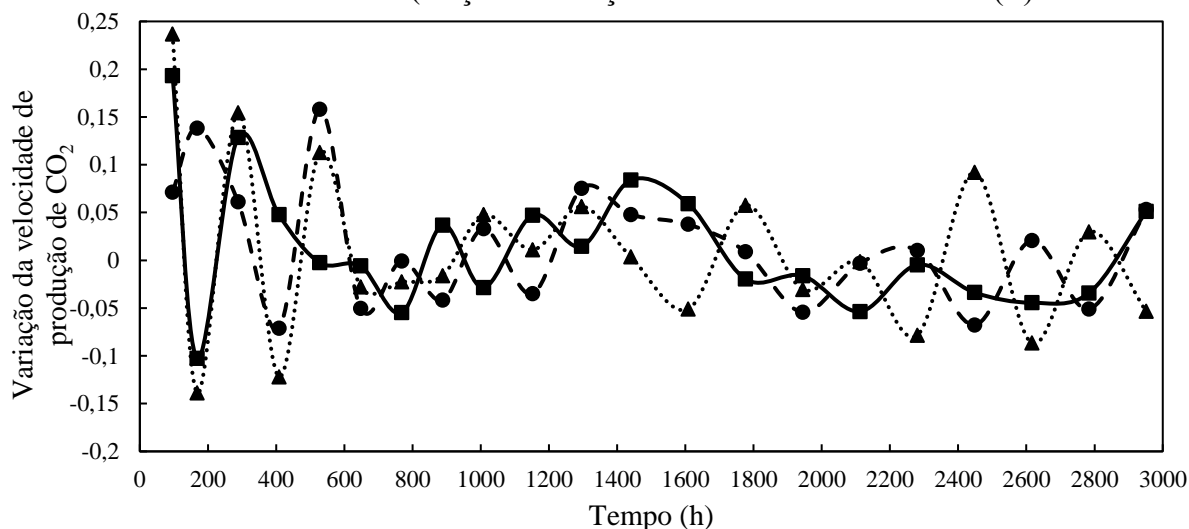
Figura 8 - Produção de CO₂ acumulada durante 122 dias no solo contaminado com misturas, B10 (10 % biodiesel/90 % diesel) (—■—), B10 8 % (adição de solução de biossurfactante a 8 %) (---●---), B10 10 % (adição de solução de biossurfactante a 10 %) (···▲···).



Fonte: elaborada pelo autor.

A Figura 9 apresenta a variação da velocidade de produção de CO₂ do solo contaminado com as misturas B10 (mistura na proporção de 10 % biodiesel/90 % diesel), durante os 122 dias de biodegradação. As maiores variações de velocidades de produção de CO₂ foram registradas no período de 550 horas (\pm 23 dias). Após 23 dias, a variação da velocidade foi estável.

Figura 9 - Variação da velocidade de produção de CO₂ no solo contaminado com mistura B10 (▲), com a mistura B10 8 % (adição de solução de biossurfactante a 8 %) (■) e com a mistura B10 10 % (adição de solução de biossurfactante a 10 %) (●).



Fonte: elaborada pelo autor.

No presente estudo a adição de 7 % de biodiesel ao diesel não aumentou a produção de CO₂ quando comparado ao solo com óleo diesel puro. Mesmo a adição de 10 % de biodiesel no óleo diesel produziu 13,13 mmol de CO₂, enquanto o óleo diesel puro produziu 12,95 mmol de CO₂.

Foi possível observar que as misturas B7 e B10 e as misturas em que foram adicionadas diferentes concentrações de biossurfactantes apresentaram variação de velocidades de produção de CO₂ muito altas nas primeiras horas. Isso pode ser devido a rápida biodegradação da porção de biodiesel na mistura e, também, pela rápida biodegradação de alguns compostos do óleo diesel. Após, aproximadamente, 500 horas (\pm 20 dias), a variação da velocidade de produção de CO₂ foi estável, pois nesse momento restou apenas os compostos persistentes, os quais são de difícil biodegradação.

Yassine et al. (2013) sugeriram que os FAME do biodiesel são capazes de co-solubilizar os n-alcanos do óleo diesel. Os autores ainda puderam observar que a metabolização de C10-C21 n-alcanos do óleo diesel foram significativamente maiores, quando na presença de biodiesel.

De modo geral, a concentração de biodiesel não teve um impacto positivo na produção de CO₂ do solo contaminado quando comparado com o solo contaminado com o óleo diesel puro. Por outro lado, a adição de biossurfactante proporciona uma pequena melhora, em termos de produção de CO₂, no solo contaminado com a mistura B10, quando comparado com a produção de CO₂ do solo contaminado com óleo diesel puro. A produção de CO₂ teve um aumento de 23,55 % no solo contaminado com a mistura B10 8 % e aumento de 10,34 % no solo contaminado com a mistura B10 10 %.

A adição do biodiesel atua como um co-substrato para a biodegradação do diesel de petróleo, porém a origem da matéria prima do biodiesel pode variar o perfil de biodegradação da mistura, visto que biodiesel de origem vegetal e animal podem diferir quanto a biodegradação (SORIANO et al., 2015).

5.4 Teste de germinação em solo contaminado após biodegradação

As sementes de *Cucumis sativus* e *Lactuca sativa* apresentaram sensibilidades diferentes quando exposta ao solo contaminado. O alongamento da raiz de *L. sativa* foi inibido, de modo que não foi possível comparar o nível de inibição entre as diferentes amostras de solo. Por outro lado, as sementes de *C. sativus* apresentou diferentes níveis de inibição do alongamento da raiz

nas diferentes amostras de solo. Embora as sementes tenham apresentados níveis de sensibilidade diferentes, *L. sativa* e *C. sativus* foram sensíveis ao solo contaminado com biodiesel após biodegradação, como pode ser observado na Figura 10. As sementes não apresentaram sinal de germinação, indicando toxicidade do substrato.

Figura 10 - Sementes de *Lactuca sativa* e *Cucumis sativus* exposta por 120 h em solo contaminado com biodiesel após biodegradação em BOD a 28°C.



Fonte: elaborada pelo autor.

A média de alongamento da raiz de *C. sativus* está registrada na Tabela 3. O alongamento da raiz foi altamente inibido pela exposição ao solo contaminado após 122 dias de incubação. As porcentagens de redução do alongamento da raiz em relação ao controle foram todas superiores a 50 %. Os solos com as misturas B7, B10 8 % e B10 10 % apresentaram as maiores médias em relação ao controle, respectivamente, apesar da alta porcentagem de redução do alongamento das raízes.

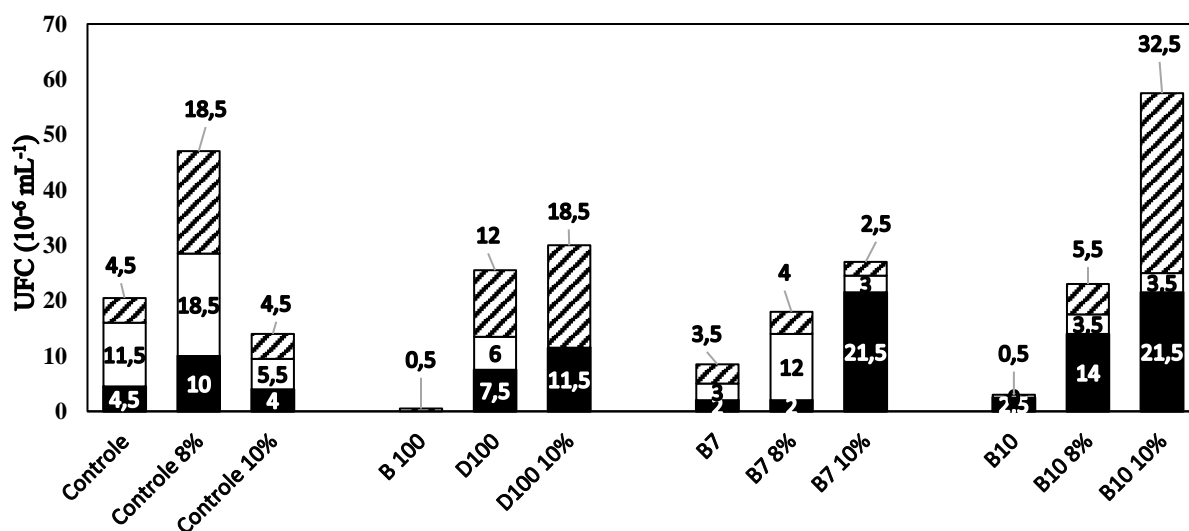
Tabela 3 - Média de alongamento da raiz de *Cucumis sativus* e porcentagem de redução do alongamento da raiz no solo contaminado em relação ao controle (sem contaminação).

	Média (cm)	Desvio Médio	% de redução
Controle	3,63	0,21	--
B100	0,00	0,00	100 %
D100	0,13	0,18	96,4 %
B7	1,37	0,35	62,2 %
B7 8 %	0,58	0,05	84 %
B7 10 %	0,50	0,26	86 %
B10	0,80	0,03	77,9 %
B10 10 %	1,11	0,16	69,6 %
B10 8 %	1,21	0,02	66,6 %

5.5 Plaqueamento do solo após biodegradação

O solo dos respirômetros foram submetidos a plaqueamento para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias registrados na Figura 11. Pode-se observar que o solo contaminado com biodiesel puro teve um impacto na comunidade bacteriana tão severo que não foi possível detectar colônias pelo método de plaqueamento. A inibição pode estar relacionada ao baixo pH do solo após biodegradação. Silva et al. (2012) também observaram uma redução no número de UFC, após 60 dias de biodegradação do biodiesel no solo. Os autores atribuem o baixo número de UFC no solo após 60 dias de biodegradação devido a seleção de grupos microbianos específicos para biodegradar o biodiesel. As misturas B10 adicionadas 10 % de biossurfactante foi a amostra com maior número de UFC ao final de 122 dias de incubação do solo. A adição de 8 % de biossurfactante ao solo aumentou as quantidades de UFC bacterianas em todos os períodos analisados, enquanto que concentração de 10 % manteve a quantidade de UFC próximas do controle.

Figura 11 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para solos contaminados em 30 dias (■) em 60 dias (□) e em 122 dias de biodegradação (▨). O gráfico corresponde ao número de UFC em meio *plate count agar* (PCA) e diluição 10^{-6} para contagem de UFC bacteriana.



Fonte: elaborada pelo autor.

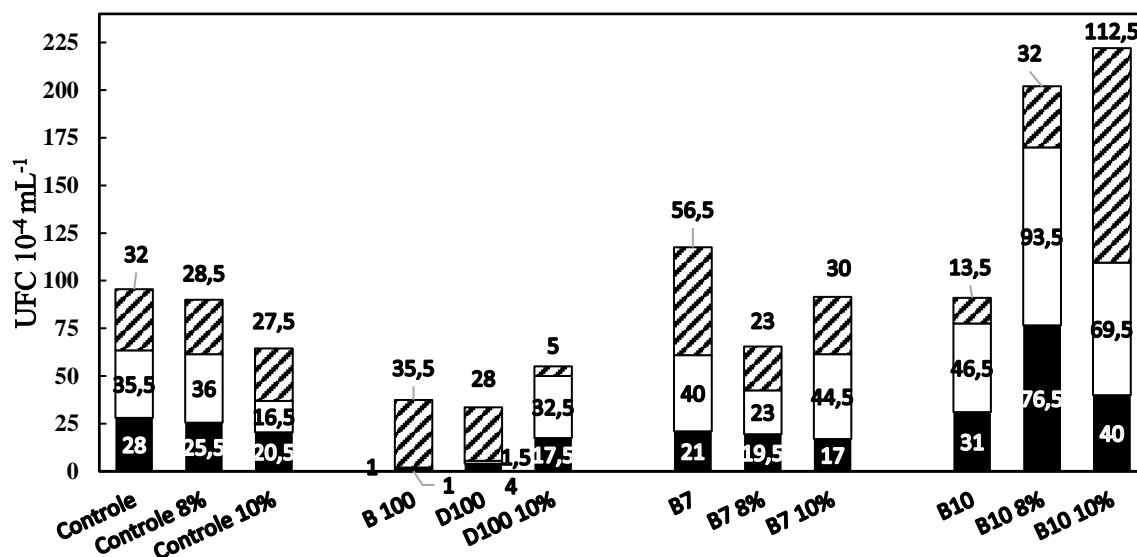
A contagem de unidades formadoras de colônias fúngicas existente nos solos dos respirômetros durante 122 dias de biodegradação está mostrada na Figura 12. A comunidade de fungos foi muito afetada pela contaminação com biodiesel e diesel. Nos 30 primeiros dias de

incubação apenas 1 UFC foi contabilizada no solo contaminado com biodiesel e apenas 4 UFC no solo contaminado com óleo diesel. Após 122 dias de incubação houve crescimento de UFC de fungos no plaqueamento de solo contaminado com biodiesel (B100), fato que não ocorreu em 30 e 60 dias.

Comparando a contagem de UFC de fungos nos solos controles (sem contaminação) e o solo contaminado com a mistura B10 com a adição do biossurfactante a 8 % e 10 % houve aumento no número de UFC de fungos em todos os tempos de incubação. Por outro lado, apenas a o solo contaminado com as misturas B7, após 122 dias de incubação, obteve UFC acima da quantidade registradas no solo controle.

A contagem de fungos no solo controle com adição de biossurfactantes foram similares ao solo controle. Joshi et al. (2008a) mostraram que espécies de *Chrysosporium indicum*, *Alternaria burnsii*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium udum*, *Trichoderma herzanium* e *Rhizoctonia bataticola* foram inibidas pela produção de biossurfactante no meio. Por outro lado, não houve nenhuma inibição no crescimento de *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum* no meio contendo biossurfactante produzido por uma linhagem de *Bacillus*. Portanto, a ação fungicida do biossurfactante depende da susceptibilidade do micro-organismo. Esta ação pode ser muito mais intensa em culturas puras que em amostras ambientais. Kim et al. (2010) mostraram que outros lipopeptídeos como, fengicinas e iturinas, produzidos por *Bacillus* sp apresentaram ação antifúngica muito maior que a surfactina.

Figura 12 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para solos contaminados em 30 dias (■) em 60 dias (□) e em 122 dias de biodegradação (▨). O gráfico corresponde ao número de UFC em meio Sabouraud e diluição 10^{-4} para contagem de UFC fúngica.



Fonte: elaborada pelo autor.

A redução no número de UFC de fungos no solo contaminado com biodiesel em 30 e 60 dias pode não estar relacionada ao pH do solo, visto que fungos tem plenas condições de crescer em ambientes de baixo pH. Portanto, outros compostos gerados na biodegradação do biodiesel como moléculas de ácidos graxos livres e moléculas de álcoois foram capazes de inibir o crescimento de fungos (YANG et al., 2000; WALTERS et al., 2004; SOUSA et al., 2007; POHL et al., 2011).

5.6 PH do solo após biodegradação.

As aferições de pH (CaCl_2 0,01 M) do solo contaminado após 122 dias de incubação estão na Tabela 4 (FOTYMA et al., 1998). O solo controle permaneceu ácido, pH por volta de 5, durante os 122 dias de incubação. No entanto, a biodegradação do biodiesel no solo reduziu o pH do solo para $3,27 (\pm 0,19)$. Esse resultado, corrobora com ausência de UFC bacterianas no solo contaminado com biodiesel. No pH 3,27, as bactérias são muito inibidas, enquanto os fungos podem crescer facilmente (ROUSK et al., 2009). O pH aumenta a disponibilidade de minerais, tais como, Fe, Mn e Al e dessa forma prejudica a microbiota do solo. Os micronutrientes, Fe e Mn, são importantes para o metabolismo microbiano, porém em baixas concentrações (NEALSON e MYERS, 1992).

Tabela 4 - Medida de pH (CaCl_2 0,01 M) do solo contaminado após 122 dias de incubação.

	<i>pH</i>	σ
<i>Controle</i>	4,695	$\pm 0,025$
<i>Controle 8 %</i>	5,12	$\pm 0,01$
<i>Controle 10 %</i>	4,935	$\pm 0,045$
<i>B 100</i>	3,27	$\pm 0,19$
<i>D100</i>	4,275	$\pm 0,025$
<i>B7</i>	4,955	$\pm 0,025$
<i>B7 8 %</i>	5,525	$\pm 0,075$
<i>B7 10 %</i>	5,575	$\pm 0,275$
<i>B10</i>	4,935	$\pm 0,065$
<i>B10 8 %</i>	5,37	$\pm 0,03$
<i>B10 10 %</i>	5,475	$\pm 0,125$

Média das medidas de pH e σ (desvio padrão das amostras).

Outro fator importante a ser considerado, é a influência do pH do solo na atividade do biossurfactante. A surfactina sofre uma inibição da atividade de redução da tensão superficial em pH abaixo de 6, por não estar totalmente solúvel no meio, mas a sua estrutura química não é afetada, de acordo com Joshi et al. (2008b) e Barros et al. (2008). Assim, o pH natural do solo utilizado, por volta de 4,6, pode ter reduzido o potencial do biossurfactante no solo (redução da tensão superficial, emulsificação, etc.). A adição do biossurfactante aumentou um pouco o pH do solo em relação as amostras apenas com a mistura diesel/biodiesel (Tabela 4), isso pode ser devido ao tampão fosfato pH 7 usado para fazer a solução de biossurfactante utilizada nos testes.

5.7 Monitoramento de UFC do solo contaminado com biodiesel

Devido a alteração do pH do solo contaminado com biodiesel, após 122 dias nos respirômetros, foi realizado um monitoramento com intervalos de 10, 30 e 50 dias. Esse período de monitoramento foi escolhido, levando em conta o período no qual o biodiesel tem maior quantidade de CO_2 acumulada, além de maior velocidade de produção de CO_2 (ver Figuras 4 e 5). O monitoramento de UFC e pH do solo contaminado com biodiesel e, também, as amostras com cal sodada para o ajuste de pH estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Monitoramento do pH e UFC do solo contaminado com biodiesel durante a biodegradação.

	10 dias			30 dias			50 dias		
	pH	PCA 10 ⁶	SDA 10 ⁴	pH	PCA 10 ⁶	SDA 10 ⁴	pH	PCA 10 ⁶	SDA 10 ⁴
Controle	5,4	3	3,5	5,6	3,5	4,5	6	6,5	3,5
Controle + Ca*	11	2	1	11,84	1	1	11,1	1	4
B100	5,4	6	5,25	4,9	0	3	4,2	0	0
B100 + Ca*	7,25	33	80	7,4	44,5	79,5	6,7	38	39

*Ca: representa a adição de cal sodada, PCA: *plate count agar*; SDA: Sabouraud Dextrose agar.

O solo contaminado com biodiesel apresentou pH ácido após biodegradação. Nos primeiros 10 dias de incubação, o solo contaminado com biodiesel (B100) apresentou pH de 5,4 o mesmo pH que o solo controle. O solo contaminado com biodiesel e que foi adicionado 0,50 g de cal soldada (B100+Ca) aumentou o pH para valores próximo da neutralidade, proporcionando um crescimento maior de fungos e bactérias. Esse pH permaneceu na faixa de pH neutro mesmo com 30 dias de incubação. Por outro lado, o solo contaminado com B100 diminuiu o valor de pH para faixa de 4. Wieczorek et al. (2016) também observaram a redução do pH durante 60 dias de biodegradação do biodiesel. Esses autores atribuem a alteração do pH a formação de ácidos orgânicos durante o processo de biodegradação. Assim, fica evidente que o período de biodegradação do solo contaminado com biodiesel provocou uma acidificação do solo, provavelmente, devido a produção de ácido acético da quebra de moléculas FAME (THOMAS et al., 2017). No entanto, é importante destacar que outros metabólitos podem ter influência na inibição do crescimento microbiano, visto que apenas o baixo valor de pH não afetaria o crescimento de fungos, como ocorreu em 50 dias. No teste de biodegradação de biodiesel após 122 dias o pH chegou a valores próximos de 3, porém a comunidade de fungos conseguiu se desenvolver.

A adição de substâncias a base de cálcio com capacidade de neutralizar os íons H⁺ podem evitar a acidificação do solo em processo de biodegradação do biodiesel puro. Assim, ao equilibrar o pH, a microbiota, principalmente as bactérias, consegue crescer, como foi mostrado na contagem de UFC. Isso pode proporcionar uma biodegradação mais rápida e eficiente.

5.8 Crescimento de sementes em solo contaminado com biodiesel

As médias de alongamento da raiz de *C. sativus* expostas em solo contaminado com B100 (biodiesel puro) e B100+Ca (biodiesel e adição de 0,5 g de cal sodada) e os solos controles

estão registradas na Tabela 6. O alongamento da raiz de *C. sativus* no solo controle com adição de cal sodada foi diminuído em, aproximadamente, 49 % comparado com o solo controle (sem adição de contaminante ou reagente para corrigir o pH) como observado na Tabela 6. Esta inibição no alongamento da raiz pode estar relacionada ao aumento da condutividade para 199 $\mu\text{S}/\text{cm}$, devido a adição da cal sodada no solo.

As sementes de *C. sativus* em solo contaminado com B100 foram totalmente inibidas e a condutividade de ambos os solos contaminados estava acima dos valores do solo sem contaminação (controle).

Tabela 6 - Alongamento da raiz de *C. sativus*, porcentagem de redução do alongamento em relação ao controle e condutividade do solo após 50 dias de incubação a 28 °C.

	Média (cm)	% de redução	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Controle	5,5 \pm 0,16	--	27,3
Controle+Ca*	2,87 \pm 0,08	49,7	199
B100	0 \pm 0,00	100	258
B100+Ca*	0,87 \pm 0,14	84	497

*Ca: adição de cal sodada

Embora a adição de cal sodada no solo contaminado com biodiesel tenha suportado a manutenção do pH em valores dentro da neutralidade, o desenvolvimento das raízes foi afetado. A condutividade desse solo estava em 497 $\mu\text{S cm}^{-1}$, acima da faixa de condutividade do solo sem contaminação (controle).

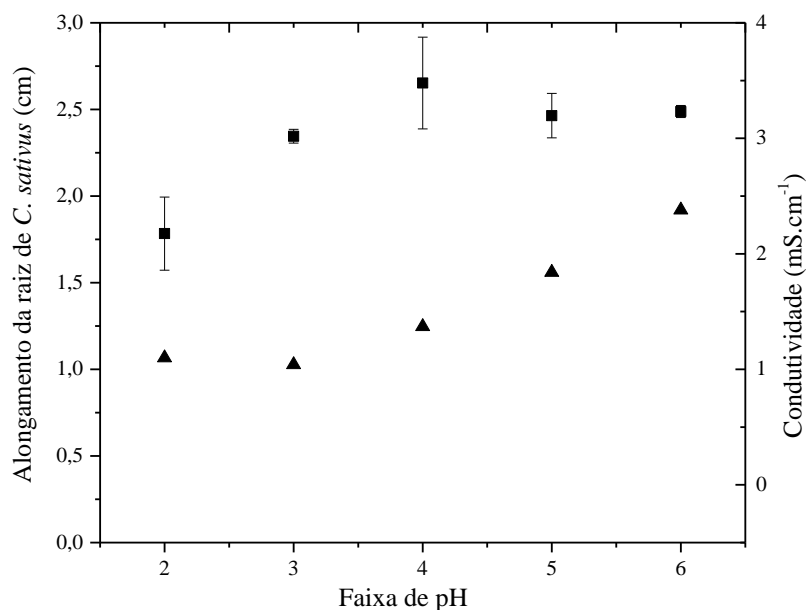
A Figura 13 apresenta a resposta das sementes de *C. sativus* frente a soluções de Na_2HPO_4 0,01 M/ácido cítrico 0,02 M em diferentes tampões e a condutividade de cada tampão. Os resultados apresentados confirmam a capacidade das sementes para desenvolver-se em uma faixa de pH de 2 a 6. O menor valor de pH do solo contaminado por biodiesel após biodegradação ficou em torno de 4,2. Portanto não foi possível atribuir apenas ao pH o poder de inibição no alongamento da raiz em solo após biodegradação do biodiesel.

Outro fator que confirmou essa hipótese é que mesmo no solo com biodiesel adicionado cal sodada o valor de pH ficou em 6,7 ao final de 50 dias, porém nenhuma semente foi capaz de germinar e desenvolver suas raízes.

A condutividade de cada tampão foi medida e apresentou valores entre 1,10 a 2,38 mS cm^{-1} como observado na Figura 13. Esses valores são muito maiores do que a condutividade do solo contaminado com biodiesel e biodiesel adicionado cal sodada após a biodegradação.

Assim, a adição da cal sodada no solo aumenta um pouco a condutividade em relação ao solo controle, mas ainda mantém uma faixa de condutividade, na qual o desenvolvimento das sementes é possível.

Figura 13 - Alongamento da raiz de *C. sativus* em tampão de Na_2HPO_4 0,01M/ácido cítrico 0,02 M em diferentes pH (■). Condutividade de cada solução tampão em mS cm^{-1} (▲). A média de alongamento da raiz de *C. sativus* em água destilada foi de 2,57 cm.



Fonte: elaborado pelo autor.

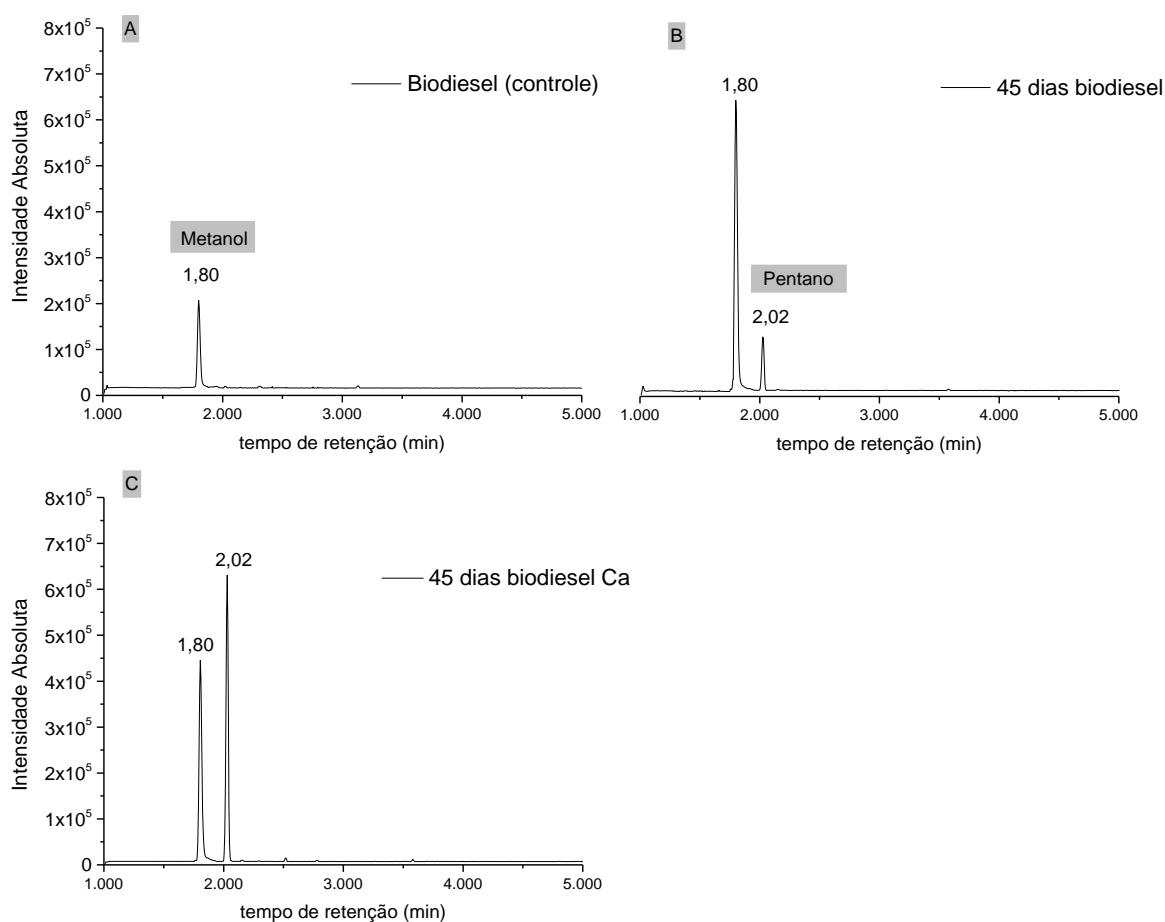
5.9 Análise do solo contaminado com biodiesel após 45 dias de incubação por GC/MS

Os espectros cromatográficos do solo contaminado com biodiesel gerados estão apresentados na Figura 14. Por meio das análises cromatográficas foi possível observar que a concentração de metanol aumentou durante o período de biodegradação do biodiesel. A via teórica de biodegradação de FAME e a geração de metanol durante a biodegradação é descrita por Thomas et al. (2017). Os autores relatam que nas primeiras reações de biodegradação de FAME ocorre a formação de ácido graxos livre e metanol. Na Figura 14A foi identificado um pico com tempo de retenção de 1,8 min correspondente ao metanol residual encontrado no biodiesel. A concentração de metanol residual no biodiesel é devido ao processo de transesterificação pelo qual o biodiesel é produzido.

Na Figura 14B foi possível observar que, após 45 dias de biodegradação do solo contaminado com biodiesel, a concentração de metanol aumentou e começou a surgir um pico

com tempo de retenção de 2 min que corresponde a uma cadeia de pentano. Essa cadeia de pentano foi muito mais intensa no solo contaminado com biodiesel adicionado cal sodada (Figura 14C), mas houve também a formação de metanol. Essa produção de metanol durante o processo de biodegradação pode ter sido responsável pelo baixo ou ausente números de UFC no solo entre 30 e 50 dias de incubação do solo, seja fungo ou bactéria.

Figura 14 - GC/MS do biodiesel (controle), do biodiesel após 45 dias de incubação e o biodiesel adicionado cal sodada para corrigir o pH.



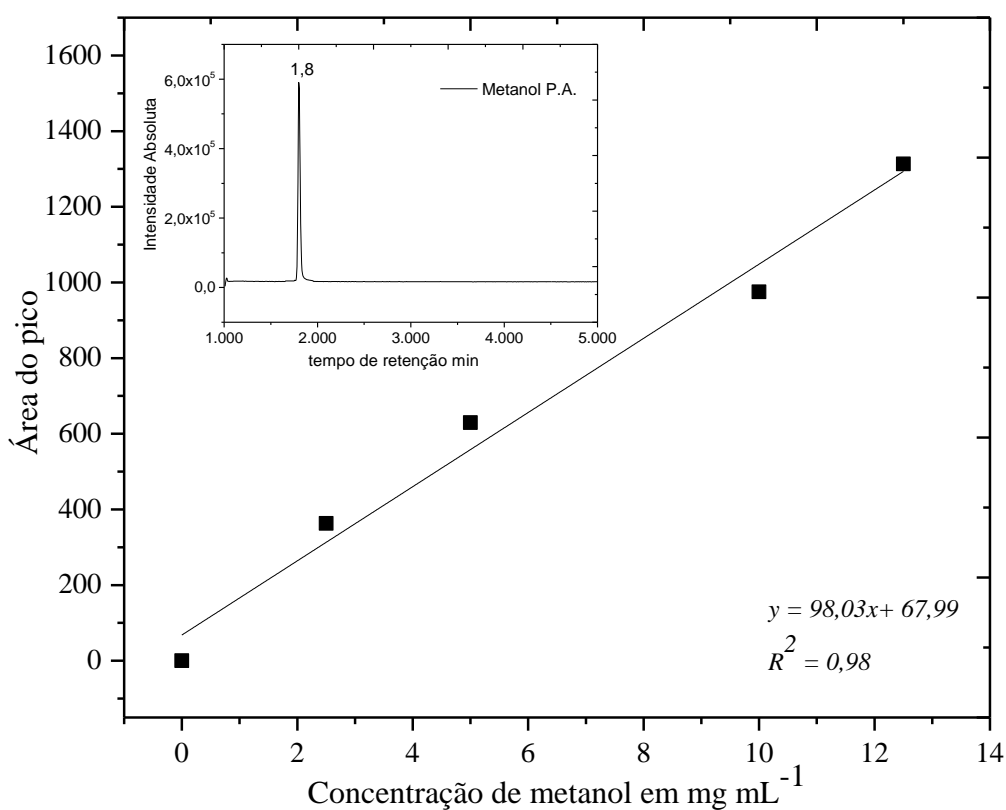
Fonte: elaborada pelo autor.

Sabendo que a quebra do biodiesel produziu moléculas de metanol e outros compostos que tornaram o solo ácido, é possível sugerir que a adição da cal sodada para a neutralização do pH, conforme os compostos ácidos eram formados, favoreceu a quebra do biodiesel em moléculas de pentano. A produção de metanol como metabólito da biodegradação do biodiesel pode ter provocado a fitotoxicidade para as sementes de *C. sativus*, visto que a faixa de pH e

condutividade usadas neste experimento não seriam suficientes para causar efeitos inibitórios de crescimento para a semente.

A Figura 15 apresenta a curva de calibração utilizada para calcular a concentração de metanol produzida durante os 45 dias de biodegradação do solo contaminado com biodiesel. A Figura 15 também indica o tempo de retenção de 1,8 min para o metanol P.A., que é o mesmo tempo de retenção das amostras apresentados na Figura 14. O espectro do metanol foi identificado pelo software com 98 % de similaridade.

Figura 15 - Curva de calibração do metanol P.A. e pico do metanol P.A. no CG/MS.



Fonte: elaborada pelo autor.

A curva de calibração com metanol P.A. permitiu calcular a concentração de metanol nas amostras. O biodiesel utilizado neste estudo continha 2,29 mg mL⁻¹ de metanol. O biodiesel contém uma concentração de metanol residual devido ao processo de produção. Tal processo faz uso do metanol para transesterificação de óleo ou gorduras. O processo de atenuação natural do solo contaminado com biodiesel elevou a concentração de metanol para 9,67 mg mL⁻¹, o que equivale a um aumento de 322 % desse composto. O solo contaminado com biodiesel com pH

neutralizado elevou a produção de metanol para 6,61 mg mL⁻¹, o que corresponde a um aumento percentual de 188 % em relação ao biodiesel (controle).

Tabela 7 - Quantificação de metanol nas amostras de biodiesel antes e após 45 dias de incubação do solo.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração de metanol mg mL⁻¹</i>	<i>Aumento (%)</i>
Biodiesel puro (controle)	2,29 ± 0,00	---
Solo contaminado com biodiesel após 45 dias	9,67 ± 0,69	322
Solo contaminado com biodiesel após 45 dias e pH neutralizado	6,61 ± 0,71	188

De acordo com os resultados obtidos e os dados da literatura é possível constatar que a biodegradação do biodiesel no solo provocou um grande impacto no pH do solo ao longo do tempo de biodegradação e alterou as condições de crescimento microbiano. Essa alteração perdurou por mais de 50 dias, quando a comunidade fúngica começou a se reestabelecer. No entanto, as sementes ainda não desenvolveram, devido a produção de metanol que contribuiu para a fitotoxicidade e alteração da comunidade de micro-organismos do solo. A presença do metanol pode ter selecionado micro-organismos metilotróficos, que não foram contemplados nos meios de cultivo utilizados neste estudo.

A biodegradação do biodiesel no solo acontece rapidamente, se comparado ao óleo diesel derivado do petróleo, porém ainda requer cuidados quando liberado no ambiente, devido ao poder de impactar a microbiota e o desenvolvimento de sementes no solo nos primeiros dias de biodegradação.

Com base nos resultados obtidos pode-se sugerir que a mistura de pequenas quantidades de biodiesel no diesel reduz o tempo de adaptação dos micro-organismos, fase *lag*, ao acelerar a produção de CO₂ em relação ao solo contaminado apenas com diesel. Porém, essa rápida produção de CO₂ pode estar relacionada a porção de biodiesel na mistura, visto que ao final de 122 dias o CO₂ acumulado é similar tanto nas misturas diesel/biodiesel quanto o solo contaminado com óleo diesel. Transcorridos os 122 dias de incubação, o processo de biodegradação não foi suficiente para reduzir a fitotoxicidade do solo contaminado, principalmente o solo com biodiesel. Posteriormente, o monitoramento do solo contaminado com biodiesel em intervalos mais curtos de tempo, mostrou que essa acidificação foi provocada durante o processo de biodegradação do biodiesel. No entanto, a adição de uma base neutralizou

o pH do solo durante o processo de biodegradação. Por outro lado, as análises de GC/MS mostraram que a quantidade de metanol aumentou muito após a biodegradação e este composto pode ter sido o principal responsável pela toxicidade para e sementes e seleção de micro-organismos com capacidade de degradação do metanol.

6 Considerações finais

A adição de biodiesel ao diesel acelera a produção de CO₂ em relação a amostra de óleo diesel puro.

A mistura B10 10 % aumentou o número de UFC bacterianas e fúngicas.

A solução de biossurfactante bruto a 8 % foi capaz de aumentar a produção de CO₂ do solo tanto com a mistura B7 como a mistura B10.

A solução de biossurfactante a 10 % não estimulou a atividade microbiana no solo contaminado.

A biodegradação do biodiesel acidificou o solo e gerando moléculas de metanol e pentano como compostos intermediários da biodegradação. Tais compostos podem ter contribuído, como principais agentes, para a fitotoxicidade e seleção dos micro-organismos do solo.

Referências

- ALVAREZ, V. M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J. M.; DE SOUZA, P. M.; DE ARAÚJO, L. V.; BARROS, T. G.; DE SOUZA, R. O. M. A.; FREIRE, D. M. G.; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 14–21, 2015.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14283 Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.
- ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS INTERNATIONAL. Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels, ASTM D6751-09., West Conshohocken, PA, 2009.
- BARROS, F. F. C.; de QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia do Alimento*, v. 28, p. 979-985, 2008.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, v. 100, p. 68-70, 1965.
- BEZZA, F. A.; BEUKES, M.; CHIRWA, E. M. N.; Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1911–1922, 2015.
- BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/lei/113033.htm>.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557–577, 2010.
- BUCKER, F. Biodeterioração de misturas de diesel e biodiesel e seu controle com biocidas. Julho de 2009. 147 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- CHRZANOWSKI, Ł.; DZIADAS, M.; ŁAWNICZAK, Ł.; CYPLIK, P.; BIAŁAS, W.; SZULC, A.; LISIECKI, P.; JELEN, H. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel / B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 328–335, 2012.
- COLLA, T. S.; ANDREAZZA, R.; BÜCKER, F.; DE SOUZA, M. M.; TRAMONTINI, L.; PRADO, G. R.; FRAZZON, A. P. G.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 2592-2602, 2014.
- CRUZ, J. M.; TAMADA, I. S.; LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 225, p. 1962-1965, 2014.

DA CRUZ, A. C. S.; LEITE, M. B. N. L.; RODRIGUES, L. E. A.; NASCIMENTO, I. A. Estimation of biodiesel cytotoxicity by using acid phosphatase as a biomarker of lysosomal integrity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, p. 219–224, 2012.

DA CUNHA, M. E.; KRAUSE, L. C.; MORAES, M. S. A.; FACCINI, C. S.; JACQUES, R. A.; ALMEIDA, S. R.; RODRIGUES, M. R. A.; CARAMÃO, E. B. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. *Fuel Processing Technology*, v. 90, p. 570–575, 2009.

DIFCO. *Difco Manual*. Difco Laboratories, Detroit, 1984.

EN - EUROPEAN STANDARDIZATION. EN 14214:2008+A1:2009 Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements and test methods: BSI British Standards, 2010.

FISHER, C. R.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; STEPHANOPOULOS, G. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic Engineering*, v. 10, p. 295-304, 2008.

FOTYMA, M.; JADCZYSZYN, T.; JOZEFACIUK, G. Hundredth molar calcium chloride extraction procedure. part II: Calibration with conventional soil testing methods for pH. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 29, p. 1625-1632, 1998.

HALLENBECK, P. C.; GROGGER, M.; MRAZ, M.; VEVERKA, D. Solar biofuels production with microalgae. *Applied Energy*, v. 179, p. 136-145, 2016.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS*, v. 103, p. 11206–11210, 2006.

JI, Y.; MAO, G.; WANG, Y.; BARTLAM, M. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1–13, 2013.

JOHNSON, T. J.; HALFMANN, C.; ZAHLER, J. D.; ZHOU, R.; GIBBONS, W. R. Increasing the tolerance of filamentous cyanobacteria to next-generation biofuels via directed evolution. *Algal Research*, v. 18, p. 250-256, 2016.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *B. subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4603-4608, 2008a.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 195-199, 2008b.

KALRA, Y. P. Determination of pH of soils by different methods: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 78, p. 310-324, 1995.

KIM, P.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 138-145, 2010.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSK, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 2327-2339, 2013.

- MARIAAMALRAJ, S. K.; PASUMARTHI, R.; ACHARY, A.; MUTNURI, S. Effect of rhamnolipid on biodegradation of hydrocarbons in non-aqueous-phase liquid (NAPL). *Biodegradation Journal*, v. 20, p.1-11, 2016.
- MOSER, B. R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 45, p. 229–266, 2009.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-198, 2005
- NEALSON, K. H.; MYERS, C. R. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 439–443, 1992.
- PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, v. 111, p. 259-268, 2013.
- PLAZA, G. A.; TUREK, A.; KRÓL, E.; SZCZYGLÓWSKA, R. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, p. 3165-3170, 2013.
- POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A Review. In: A. MÉNDEZ-VILAS (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 1. ed. [s.l.] FORMATEX, 2011. p. 61–71.
- ROUSK, J.; BROOKES, P. C.; BÅÅTH, E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 1589–1596, 2009.
- SALADINI, F.; PATRIZI, N.; PULSELLI, F. M.; MARCHETTINI, N. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 66, p. 221-227, 2016.
- SHAHIMIN, M. F. M.; FOGHT, J. M.; SIDDIQUE, T. Preferential methanogenic biodegradation of short-chain n-alkanes by microbial communities from two different soil sands tailings ponds. *Science of the Total Environment*, v. 553, p. 250-257, 2016.
- SIDDIQUI, S.; ADAMS, W. A.; SCHOLLION, J. The phytotoxicity and degradation of diesel hydrocarbons in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 164, p. 631–635, 2001.
- SILVA, G. S.; MARQUES, E. L. S.; DIAS, J. C. T.; LOBO, I. P.; GROSS, E.; BRENDEL, M.; DA CRUZ, R. S.; REZENDE, R. P. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Applied Soil Ecology*, v. 55, p. 27–35, 2012.
- SHOEMAKER, H. E.; Mc LEAN E. O.; PRATT, P. F. Buffer methods for determining lime requirement of soil with appreciable amounts of extractable aluminium. *Soil Science Society of America Proceedings*, v. 25, p. 274-277, 1961.
- SØRENSEN, G.; PEDERSEN, D. V.; NØRGAARD, A. K.; SØRENSEN, K. B.; NYGAARD, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresources Technology*, v. 102, p. 5259-5264, 2011.
- SORIANO, A. U.; MARTINS, L. F.; VENTURA, E. S. A.; DE LANDA, F. H. T. G.; VALONI, É.A.; FARIA, F. R. D.; FERREIRA, R. F.; FALLER, M. C. K.; VALÉRIO, R. R.; LEITE, D. C. A.; DO

CARMO, F. L.; PEIXOTO, R. S. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 102-114, 2015.

SOUSA, D. Z.; PEREIRA, M. A.; STAMS, A. J. M.; ALVES, M. M.; SMIDT, H. Microbial communities involved in anaerobic degradation of unsaturated or saturated long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1054–1064, 2007.

TABATABAEI, M.; KARIMI, K.; HORVÁTH, I. S.; KUMAR, R. Recent trends in biodiesel production. *Biofuel Research Journal*, v. 7, p. 258-267, 2015.

THOMAS, A. O.; LEAHY, M. C.; SMITH, J. W. N.; SPENCE, M. J. Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, v. 2009, 2017.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, v. 22, p. 231-241, 2011.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia*, v. 157, p. 87–90, 2004.

WIECZOREK, D.; MARCHUT-MIKOLAJCZYK, O.; STRZELECKI, B.; GAJEWSKA, M.; POLEWCZYK, A.; ANTCZAK, T. The effect of tert-butylhydroquinone (TBHQ) on biodiesel bioremediation in soil samples inoculated with bacterial cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 115, p. 205-211, 2016.

YANG, F.; KE, Y.; KUO, S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 295–301, 2000.

YASSINE, M. H.; WU, S.; SUIDAN, M. T.; VENOSAS, A. D. Aerobic biodegradation kinetics and mineralization of six petrodiesel/soybean-biodiesel blends. *Environmental Science & Technology*, v. 47, p. 4619–4627, 2013.

YERGEAU, E.; SANSCHAGRIN, S.; BEAUMIER, D.; GREER, C. W. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS One*, v. 7, p. 1–10, 2012.

*COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO CONTAMINADO COM MISTURAS
DIESEL/BIODIESEL APÓS BIODEGRADAÇÃO*

1 Introdução

As atividades antropogênicas resultam em diversas fontes de contaminações que podem afetar a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana do solo. De modo geral, contaminantes como o óleo diesel (derivados do petróleo) são conhecidos pela toxicidade para muitos grupos de micro-organismos. Por outro lado, determinados grupos de micro-organismos são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos, o que garante a biodegradação dessas substâncias no meio ambiente (SUTTON et al., 2013).

Durante muito tempo, os métodos dependentes de cultivo era a ferramenta utilizada para isolar e estudar linhagens microbianas com alto poder de biodegradação do contaminante alvo (GHAZALI et al., 2004). No entanto, esse método não retratava toda a comunidade envolvida na biodegradação dos contaminantes, devido a presença de micro-organismos que não são passíveis de isolamento em meio de cultivo ou pelos padrões de crescimento desconhecidos de alguns micro-organismos. Embora o método dependente de cultivo tenha proporcionado um grande conhecimento acerca dos processos de biodegradação, atualmente os métodos independentes de cultivo, chamado também metagenômica, possibilitou o conhecimento de uma parcela de micro-organismos ainda desconhecidos, além de revelar as relações ecológicas dos micro-organismos em torno do processo de biodegradação no meio ambiente (STEFANI et al., 2015)

A microbiota do solo é extremamente diversa e a metagenômica tem apenas esclarecido que a diversidade genômica armazenada no solo é muito maior do que conhecemos. Assim, o desafio da metagenômica é captar, de forma fidedigna, toda a heterogeneidade do ambiente e a dinâmica das comunidades microbianas ao longo do tempo e espaço (DANIEL, 2005).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar a comunidade bacteriana do solo após 122 dias de biodegradação das misturas diesel/biodiesel e biodiesel puro para comparação com as amostras de solo sem contaminação (Controle), bem como as amostras com adição de biossurfactante.

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) para análise das diferenças entre os perfis das comunidades bacterianas dos solos contaminados.
- Comparar a comunidade bacteriana no solo com a adição de diferentes concentrações de biossurfactante.
- Relacionar a ocorrência de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) compartilhadas nos diferentes solos contaminados.
- Analisar a similaridade entre as amostras de solo.

3 Revisão bibliográfica

3.1 *Diversidade microbiana em solo contaminado*

O solo mantém funções biológicas fundamentais e insubstituíveis como a promoção do crescimento de plantas, os ciclos biogeoquímicos, além de manter uma população que incluem a macrofauna, mesofauna, microfauna e microflora.

O acesso a diversidade de micro-organismos do solo através de métodos dependentes de cultivo é limitado devido as condições ambientais nas quais determinados micro-organismos se desenvolvem. Na maioria dos casos não é possível reproduzir em laboratório as condições ambientais necessárias para o crescimento do micro-organismo ou falta conhecimento sobre as condições de cultivo do micro-organismo em questão. A classificação filogenética de micro-organismos, aloca os diferentes grupos microbianos em três grandes Domínios: Bacteria, Archaea, que é o grupo das arqueobactérias e Eucarya que inclui um grande número de seres-vivos dentre eles os fungos e protozoários (MADIGAN et al., 2016).

Os métodos independentes de cultivo permitem uma abordagem ampla dos micro-organismos do ambiente por ser capaz de acessar o DNA total da comunidade. Além disso, reflete a estrutura da comunidade microbiana.

A biodegradação de moléculas compostas como o óleo diesel promovem um grande impacto na comunidade microbiana do solo, visto que é um composto recalcitrante. Por outro lado, há grupos microbianos capazes de biodegradar diferentes frações do óleo diesel. Por isso, durante a biodegradação de substâncias compostas ocorre uma sucessão de comunidades microbianas no local contaminado. A contaminação pode alterar o ambiente de modo a tornar espécies que apresentavam baixa riqueza em espécies dominantes, e por outro lado, extinguir espécies que eram dominantes no ambiente antes da contaminação (YERGEAU et. al., 2012). As diferentes comunidades microbianas têm diferentes funções no processo de biodegradação de hidrocarbonetos.

O acesso a diversidade microbiana do solo impactado por contaminação fornece informações de quais grupos microbianos são resistentes a contaminação, e quais grupos estão relacionados a biodegradação do contaminante. Porém, apenas os métodos clássicos dependentes de cultivo são limitados para demonstrar a diversidade microbiana nos ambientes (JIAO et al., 2016).

Os métodos independentes de cultivo são poderosas ferramentas para acessar a diversidade microbiana em locais contaminados. Através de métodos independentes de cultivo é possível identificar e monitorar as mudanças das comunidades microbianas em ambientes que sofreram contaminação (SUTTON et al., 2013). A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) permite avaliar o perfil da comunidade microbiana, a partir da diferença nos níveis de desnaturação das fitas duplas de DNA.

A biodegradação de solo contaminado com óleo diesel reduz a diversidade microbiana devido a seleção de grupos bacterianos que possuem genes envolvidos na biodegradação do diesel. Comunidades bacterianas menos diversas mostram ser mais abundantes em genes relacionados a biodegradação de diesel como alceno monooxigenases e citocromo P450. Este fato pode ser devido a maior competitividade entre as linhagens bacterianas em uma comunidade pouco diversa, fazendo com que todas apresentem os principais genes relacionados a biodegradação do diesel (JUNG et al., 2016).

Em estudo metagenômico durante biorremediação de solo do ártico contaminado com óleo diesel, Yergeau et al. (2012) mostraram que a contaminação resultou em um aumento na abundância principalmente do filo Actinobacteria e da classe Gammaproteobacteria. No entanto, com o passar do tempo de biodegradação, o filo Actinobacteria aumentou a abundância, enquanto a classe Gammaproteobacteria teve sua abundância reduzida. No solo não contaminado, as classes ou filios mostraram diversidade taxonômica, de modo que não houve dominância de nenhuma classe ou filo.

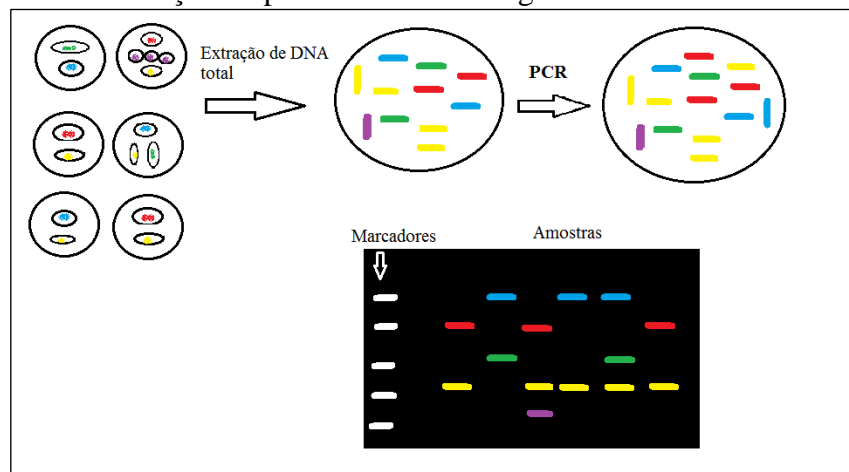
3.2 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) proporciona uma diferença na mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA amplificados pelo processo de reação de polimerização em cadeia (PCR). O gel de poliacrilamida com gradiente linear de desnaturação contém uréia e formamida, que é usado para separar os produtos amplificados da PCR.

A migração dos fragmentos de DNA produzidos no PCR acontece de forma diferente, pois uma concentração maior do desnaturante é necessário para separar as sequências com alto conteúdo de GC (guanina-citosina), devido ao número de pontes de hidrogênio que ligam esses dois nucleotídeos na fita de DNA (NAKATSU, 2007). As sequências que apresentam os mesmos pares de bases atingem um nível de desnaturação a uma determinada posição do gel e

a migração é então cessada, formando um perfil de fragmentos de DNA em diferentes posições como observado na Figura 1.

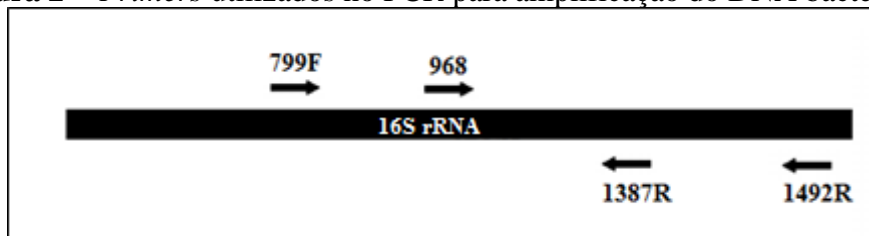
Figura 1 - Desenho esquemático da extração do DNA total, amplificação do gene alvo e a distribuição do produto de PCR no gel desnaturante.



Fonte: elaborada pelo autor.

O gene 16S rRNA são alvos para os grupos Bacteria e Archaea enquanto a região 18S rRNA para o grupo Fungi. As regiões 16S rRNA, 18S rRNA e ITS são regiões alvo para estudo de diversidade pois apresentam regiões de alta conservação de sequências em todos os micro-organismos. Assim, um mesmo par de primers pode amplificar o DNA de grande parte dos micro-organismos presentes em uma amostra ambiental. Os *primers*, também chamados de iniciadores, são moléculas extremamente importantes no processo PCR-DGGE. São elas que irão se ligar ao DNA alvo e começar a amplificação (WINTZINGERODE et al., 1997). Na Figura 2 estão registrados alguns primers universais desenhados para amplificação de DNA bacteriano, todos na região 16S.

Figura 2 - *Primers* utilizados no PCR para amplificação do DNA bacteriano.



Fonte: elaborada pelo autor.

4 Material e métodos

4.1 Extração do DNA total do solo após 122 dias de incubação

O DNA total do solo foi extraído com Kit PowerSoil da MoBio Laboratories Inc., seguindo o protocolo de extração do fabricante. A integridade do DNA foi observada em gel de agarose a 1 % (m/v). A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão tris/borato/EDTA (TBE). Foram aplicados 5µl dos DNAs extraídos junto à 3 µl do tampão de corrida Loading buffer 6x (Azul de bromofenol 0,05 % (p/v); sacarose 40 % (p/v); EDTA 0,1M (pH 8,0); SDS 0,025 % (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de base gel red e visualizado em luz ultravioleta.

4.2 Amplificação do gene alvo bacteriano (16 S rRNA) por reação de polimerização em cadeia

Na Tabela 1 está identificado os primers universais 799F/1492R que foram utilizados para amplificação do DNA bacteriano no PCR-1 e 968GC/1387 na amplificação do PCR-2. Todos os *primers* foram construídos pela empresa *IDT- Integrated DNA Technologies*.

Tabela 1 - Sequência de gene alvo utilizados como *primers* na PCR-1 e PCR-2.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Referência</i>
<i>799F</i>	5' AACMGGATTAGATACCCCKG-3'	CHELIUS e TRIPLETT (2001)
<i>1492R</i>	5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'	LANE et al., 1991
<i>968GC</i>	5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3'-GC	HEUER et al., 1997
<i>1387</i>	5'-GGGCGGWGTGTCAAGGC-3'	HEUER et al., 1997

Na Tabela 2 está registrada a composição do mix de reagentes para reação de PCR, usando os primers 799F/1492R. As condições de PCR no termociclador foram programadas em: 95 °C por 3 min, após 35 ciclos de 94 °C por 20 seg, 53 °C por 40 seg e 72 °C por 40 seg, finalmente 72 °C por 7 min, mantendo a 10 °C no final.

Tabela 2 - Mix de reagentes para reação de amplificação usando *primer* 799F/1492R.

<i>Reagentes (PRC-1)</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade</i>
Água mili-q estéril	--	16,87
<i>Primer</i> foward	100 mM	0,10
<i>Primer</i> reverse	100 mM	0,10
PCR buffer	10 X	2,50
MgCl ₂	25 mM	1,87
dNTPs	2,5 mM	2,00
BSA	20 mg/mL	0,05
Taq polimerase	5 U/μL	0,50
DNA template	--	1,00
Volume final		25 μL

Na Tabela 3 está registrado a composição do mix de reagentes para reação de PCR usando os primers 968GC/1387. O grampo de GC no primer impede a total desnaturação da fita de DNA no gel de eletroforese. As condições de amplificação da PCR foram de desnaturação inicial por 4 min a 94 °C; seguida por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C, 2 min a 72 °C; seguidos de uma extensão final por 10 min a 72 °C.

Tabela 3 - Mix de reagentes para reação de amplificação DNA bacteriano, utilizando *primer* 968GC/1387.

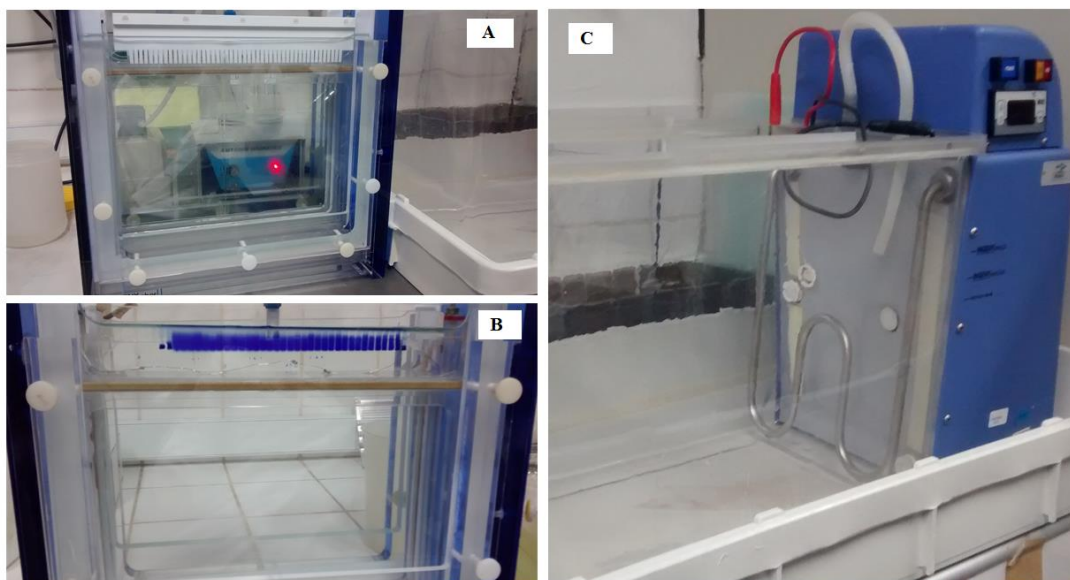
<i>Reagentes (PCR-2)</i>	<i>Concentração</i>	<i>Quantidade</i>
Água mili-q estéril	--	33,6 μL
<i>Primer</i> foward	100 mM	0,2 μL
<i>Primer</i> reverse	100 mM	0,2 μL
PCR buffer	10 X	5,0 μL
MgCl ₂	25 mM	5,0 μL
dNTPs	2,5 mM	4,0 μL
Formamida	100,0 %	0,5 μL
Taq polimerase	5 U/μL	0,5 μL
Produto do PCR 1	--	1,0 μL
Volume final		50 μL

4.3 Preparação do gel de DGGE

O gel de DGGE foi preparado com a mistura de uma solução desnaturante 0 % e uma solução desnaturante 100 % para compor um gradiente desnaturante de 45-65 %, com 6 % de poli(acrilamida). Foram adicionados as soluções desnaturantes, agentes polimerizadores de solução de persulfato de amônio a 10 % e TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine). Imediatamente após a adição dos polimerizadores, o gel foi distribuído no aparato devidamente montado com o auxílio de um misturador para garantir uma homogeneização e a composição do gradiente desnaturante (Figura 3 A). Depois de polimerizado, as amostras foram aplicadas no gel com solução tampão (Figura 3 B) e colocadas na cuba de corrida do gel de DGGE (Figura

3 C). Previamente, a cuba foi preenchida com 7 litros de tampão TAE 1X e aquecido até temperatura de 60 °C.

Figura 3 - Aparato montado com o gel de DGGE (A), as amostras aplicadas no gel (B) e a cuba de corrida do gel de DGGE (C).



Fonte: elaborada pelo autor.

A eletroforese foi mantida a temperatura de 60°C durante 16 horas à 90 V. Após as 16 h, o gel de poliacrilamida com as amostras foi corado com SYBR-gold em TAE 0,5 X no escuro por 120 min. As imagens resultantes foram usadas para conversão em matrizes de bandas com o software ImageQuant TL unidimensional - Amersham Biosciences, Amersham, UK (MCCAIG et al. 2001).

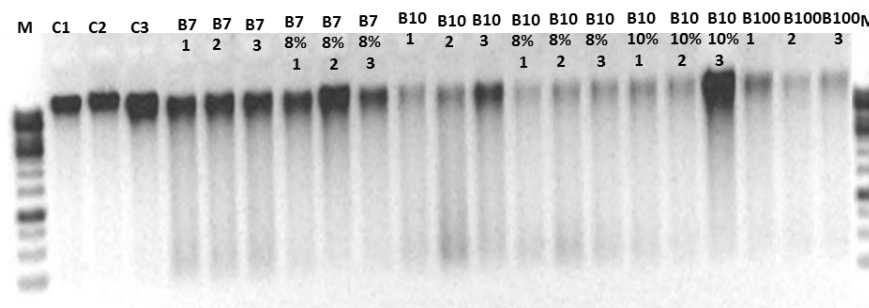
Os perfis de bandas dos géis de DGGE foram transformados em matrizes, onde as bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas consideradas como frequência destas espécies na amostra. A análise de agrupamento de tais matrizes foi feita por meio de análise dos componentes principais (PCA), realizada no programa Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). O dendrograma de similaridade foi determinado por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o agrupamento foi realizado por correlação de Pearson das curvas densitométricas das amostras. Os valores nos ramos indicam a correlação cofenética do agrupamento das amostras.

5 Resultados e discussão

5.1 Extração de DNA total

O gel de agarose com o DNA extraído das amostras de solo contaminado após 122 dias de biodegradação estão apresentados na Figura 4. Pela análise do gel de agarose pode-se observar que a quantidade de DNA total providas dos solos contaminados com maiores concentrações de biodiesel (B10 e B100) apresentam pouco DNA total quando comparado ao solo controle e a ao solo com as misturas B7 e B7 8 % como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Gel de agarose com as bandas de DNA total extraído de diferentes amostras de solo, sendo as amostras controles (réplicas 1, 2 e 3); B7 (réplicas 1, 2 e 3) B7 com solução 8 % de biossurfactante (réplicas 1, 2 e 3); B10 (réplicas 1, 2 e 3); B10 com solução de biossurfactante; a 8 % (réplicas 1, 2 e 3); B10 com solução de biossurfactante 10 % (réplicas 1, 2 e 3) e B100 puro (réplicas 1, 2 e 3). M - 1Kb - marcador de 1000 pb.



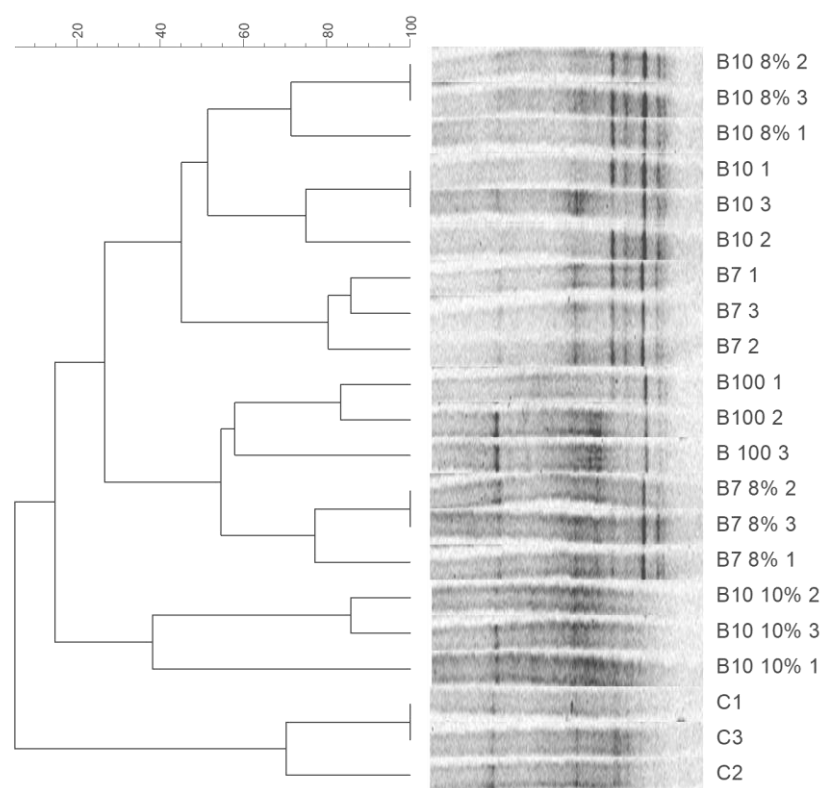
Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Análise de similaridade

A análise de DGGE permitiu avaliar as diferenças no perfil da comunidade bacteriana do solo contaminado com diferentes concentrações de biodiesel e duas diferentes concentrações de biossurfactante. A análise do dendrograma evidenciou uma maior similaridade entre as amostras do solo B10 e B10 com biossurfactante 8 % (B10 8 %). A adição de biossurfactante à 10 % (B10 10 %) provocou uma modificação no perfil da comunidade em relação as amostras B10 e B10 8 %. A concentração de biodiesel na mistura (B10 e B7) provocou mudanças na comunidade bacteriana reduzindo a similaridade entre essas comunidades. O dendrograma de similaridade deixa claro que o processo de biodegradação das misturas diesel/biodiesel muda a comunidade bacteriana do solo, em comparação ao solo não contaminado (Figura 5). As

mudanças na comunidade microbiana do solo contaminado com óleo diesel também foi observada por Jung et al. (2016). Os autores atribuem essa mudança à seleção de genes envolvidos no processo de biodegradação.

Figura 5 - Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com iniciadores para os grupos bactérias totais. As amostras de solos contaminados com diferentes concentrações de biodiesel e biossurfactante são: solo controle C; mistura B7 (7 % biodiesel/97 % diesel) e com adições de 8 % biossurfactante (B7 8 %), mistura B10 (10 % biodiesel/90 % diesel) e com adição de 8 % e 10 % de biossurfactante (B10 8 %); (B10 10 %), B100 amostras com biodiesel puro. Os números 1, 2 e 3 em todas as amostras representam as réplicas de cada contaminação.

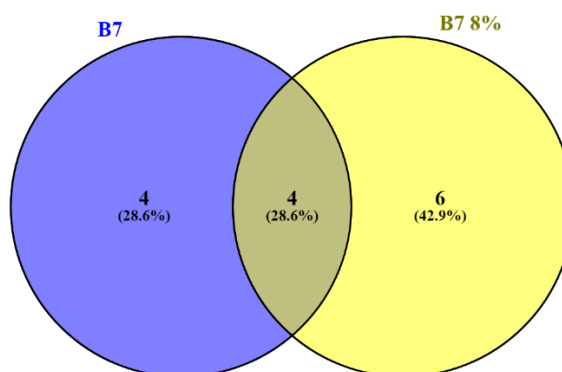


Fonte: elaborada pelo autor.

No perfil da PCR-DGGE, é possível observar a presença de bandas únicas nos tratamentos onde houve a adição de biodiesel e biossurfactante, sugerindo uma seleção de grupos bacterianos específicos desses tratamentos (Figura 5). Para melhor visualização das bandas compartilhadas e exclusivos das amostras, foram organizados diagramas de Venn apresentados nas Figuras 6, 7 e 8 com base no perfil de bandas do PCR-DGGE. Cada banda presente no gel de DGGE foi considerada como uma unidade taxonômica operacional (OTU).

O solo contaminado com as misturas B7 e B7 8 % compartilharam 4 OTUs. A mistura B7 com adição de 8 % de biossurfactante apresentaram 6 OTUs exclusivas, enquanto a mistura B7 apresentou 4 OTUs exclusivas.

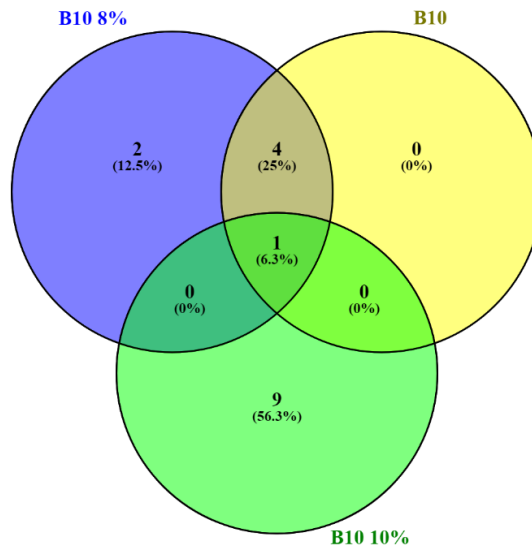
Figura 6 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre o solo contaminado com B7 e B7 8 %.



Fonte: elaborada pelo autor.

No solo contaminado com a mistura B10 e B10 adicionado 8 % de biossurfactante, compartilharam 5 OTUs enquanto B10 e B10 adicionado 10 % de biossurfactante compartilharam apenas 1 OTU (Figura 7). O perfil de bandas apresentados da amostra B10 com 10 % de biossurfactante (B10 10 %) compartilharam apenas 1 OTU com ambos, B10 e B10 8 %. Portanto, a mistura B10 com 10 % de biossurfactante estabeleceu uma comunidade bem distinta em relação a amostra sem o biossurfactante, visto que esta amostra apresenta 9 OTUs exclusivas. Sabendo que a amostra B10 não apresentou nenhuma OTU exclusiva, pode-se sugerir que a diferença nas comunidades é devido a concentração de biossurfactante.

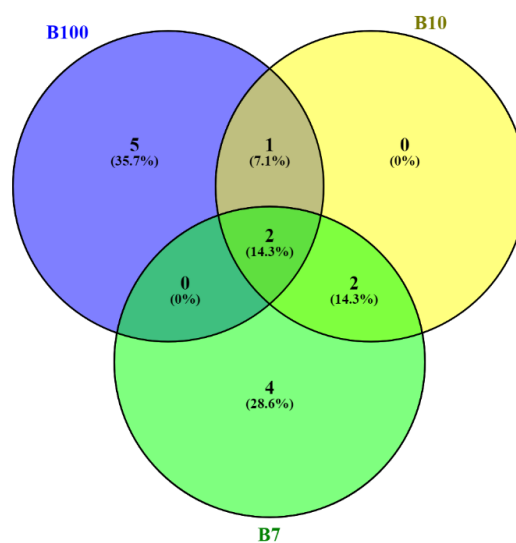
Figura 7 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre o solo contaminado com B10, B10 8 % e B10 10 %.



Fonte: elaborada pelo autor.

A diagrama de Venn também foi usado para apresentar o impacto na comunidade bacteriana com o aumento da concentração de biodiesel. Assim na Figura 8 podemos observar que das 5 OTUs encontradas no solo contaminado com a mistura B10 nenhuma delas é exclusiva, ou seja as OTUs encontradas no solo contaminado com a mistura B10 também aparecem na mistura B7 e B100. Por outro lado, no solo contaminado com a mistura B7 e B100 foram encontradas 4 e 5 OTUs exclusivas, respectivamente.

Figura 8 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre o solo contaminado com B7, B10 e B100.

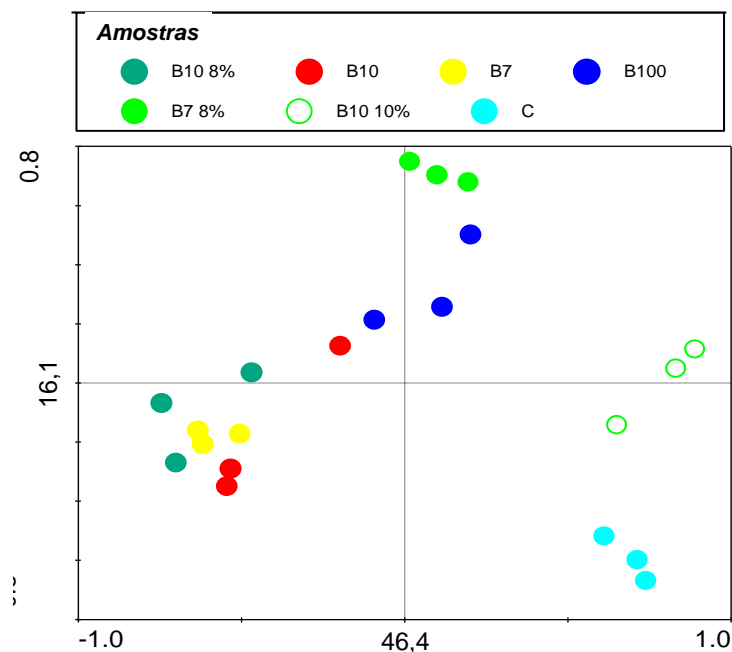


Fonte: elaborada pelo autor.

5.3 Análise de Componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para agrupar o perfil de bandas do PCR-DGGE apresentados na Figura 9. A coordenada principal 1 explicou 46,4 % a variabilidade dos dados enquanto a coordenada 2 explicou 16 % da variabilidade dos dados. A coordenada 1 separou a maior parte das amostras com adição de biossurfactante, exceto pela amostra B10 8 %. Por outro lado, a coordenada 2 separou a maior parte das amostras com diferentes concentrações de biodiesel (menores e maiores concentrações de biodiesel). A análise de PCA indicou a diferença no perfil da comunidade microbiana da amostra B10 10 % registrados anteriormente pelo dendrograma de similaridade. Comparando o perfil das amostras B10, B10 8 % e B10 10 %, pode-se observar que adição do biossurfactante a 10 % foi determinante para diferenciar o perfil da comunidade nessas amostras (Figura 9). A amostra B7 e amostra B7 8 % também foram separadas pelo coordenada 1, mostrando um perfil de comunidade distinta para ambas. A amostra contaminada com biodiesel puro (B100) também foi separada pela análise de PCA em relação ao solo controle e as amostras B7 e B10 com biossurfactante. Silva et al. (2012) também observaram diferenças entre o perfil da comunidade bacteriana em solo contaminado com B100 e as misturas de B5, B20 e B50.

Figura 9 - Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de PCR-DGGE de bactéria total. Os números após a letra B indicam as concentrações de biodiesel na mistura diesel/biodiesel (B7, B10 e B100) e após o número a concentração de biossurfactante (8 % e 10 %). As análises foram feitas em 3 repetições realizadas em cada amostra.



Fonte: elaborada pelo autor.

A contaminação do solo com mistura diesel/biodiesel, bem como as amostras com diferentes concentrações de biossurfactantes, foram capazes de alterar a comunidade do solo durante o período de biodegradação. Esta observação foi confirmada pela análise de PCA, que mostra o solo controle (sem contaminação) separados dos demais solos com contaminação como apresentados na Figura 9. Sørensen et al. (2011) também observaram mudanças na diversidade microbiana de solos contaminados com diesel puro e misturas de B5, B10, B20, B50 e B100. Os autores atribuem essa mudança à quantidade de biodiesel na mistura, pois as mudanças no perfil da comunidade são maiores em misturas acima de 20 % (B20).

A técnica da PCR-DGGE mostrou-se eficaz para determinar a resposta bacteriana aos diferentes tratamentos realizados, tanto nas amostras onde foram adicionados biodiesel quanto nas amostras onde foram aplicados biossurfactante. No entanto, o biossurfactante teve um papel mais definido na mudança do perfil das comunidades bacterianas. Esta observação foi baseada na análise do dendrograma de similaridade, no qual as amostras B7 e B10 são mais similares quando comparadas entre si, do que as suas respectivas amostras contendo biossurfactantes a 8 % (B7 8 %) e 10 % (B10 10 %). Na matriz de ordenação também foi possível observar essa

separação entre as amostras com e sem biossurfactante. O diagrama de Venn mostrou que tanto a amostra B7 8 % quanto a amostra B10 10 % apresentaram OTUs exclusivas.

É importante salientar que o biossurfactante pode ter atuado como fonte de carbono para os micro-organismos do solo, já que o biossurfactante não foi purificado e continha outros compostos no extrato bruto. Chrzanowski et al. (2012) observaram em um estudo de biodegradação de misturas diesel/biodiesel com adição de biossurfactante que o consórcio microbiano consumiu todo o biossurfactante adicionado ao processo. Deste modo, pode-se sugerir que as OTUs exclusivas encontradas nas misturas B7 8 % e B10 10 % tenham sido parcialmente atribuídas pela adição do biossurfactante.

6 Considerações finais

A introdução de misturas diesel/biodiesel e biodiesel puro provocou modificações no perfil da comunidade bacteriana quando comparadas ao solo sem contaminação.

A introdução de biossurfactante contribuiu na alteração do perfil da comunidade bacteriana.

Referências

- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, v. 41, p. 252–263, 2001.
- CHRZANOWSKI, Ł.; DZIADAS, M.; ŁAWNICZAK, Ł.; CYPLIK, P.; BIAŁAS, W.; SZULC, A.; JELEN, H. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 328–335, 2012.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 470–478, 2005.
- GHAZALI, F. M.; NOOR, R.; ABDUL, Z.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 54, p. 61–67, 2004.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.
- JIAO, S.; CHEN, W.; WANG, E.; WANG, J.; LIU, Z.; LI, Y.; WEI, G. Microbial succession in response to pollutants in batch-enrichment culture. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-11, 2016.
- JUNG, J.; PHILIPPOT, L.; PARK, W. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–10, 2016.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, 1991. p. 115-175.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.
- MCCAIG, A. E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J. I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 4554-4559, 2001.
- NAKATSU, C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*, v. 71, p. 562–571, 2007.
- RASTOGI, G.; SANI, R. K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*: Springer, 2011. p. 29–57.
- SILVA, G. S.; MARQUES, E. L. S.; DIAS, J. C. T.; LOBO, I. P.; GROSS, E.; BRENDEL, M.; DA CRUZ, R. S.; REZENDE, R. P. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Applied Soil Ecology*, v. 55, p. 27–35, 2012.
- STEFANI, F. O. P.; BELL, T. H.; MARCHAND, C.; LA PROVIDENCIA, I. E.; YASSIMI, A.; ARNAUD, M.; HIJRI, M. Methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *PLoS ONE*, v. 10, p. 1–16, 2015.

SØRENSEN, G.; PEDERSEN, D. V.; NØRGAARD, A. K.; SØRENSEN, K. B.; NYGAARD, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresources Technology*, v. 102, p. 5259–5264, 2011.

SUTTON, N. B.; MAPHOSA, F.; MORILLO, J. A.; AL-SOUD, W. A.; LANGENHOFF, A. A. M.; GROTEHUIS, T.; RIJNAARTS, H. H. R.; SMIDT, H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, p. 619-630, 2013.

WINTZINGERODE, F.; GOBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, 213-229, 1997.

YERGEAU, E.; SANSCHAGRIN, S.; BEAUMIER, D.; GREER, C. W. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS ONE*, v. 7, p. 1-10, 2012

Conclusão Geral

- O glicerol, co-produto da produção do biodiesel, foi uma boa fonte de carbono para a produção de biossurfactante até concentração de 5 %.

- O glicerol não foi eficaz como co-substrato para auxiliar na biodegradação de misturas diesel/biodiesel.

- A adição de porcentagens de biodiesel até 10 %, como comercializada atualmente no Brasil, não apresentou grande diferença na quantidade de CO₂ acumulado entre as misturas e o diesel, ou seja, a atividade microbiana ao final de 4 meses foi similar a atividade do solo contaminado com óleo diesel.

- A adição de biossurfactante até concentrações de 10 % mudou o perfil da comunidade bacteriana do solo, mas não aumentou a atividade dos micro-organismos do solo, em termos de produção de CO₂ acumulado.

- As concentrações de 5 %, 8 % e 10 % de biossurfactante não causaram grande aumento na atividade microbiana do solo contaminado com as misturas diesel/biodiesel.

- Os solos contaminados com as misturas diesel/biodiesel, diesel e também com o biodiesel permaneceram com altos níveis de fitotóxicos após 4 meses sob ação dos micro-organismos do solo.

- A biodegradação de biodiesel, além de provocar a acidificação do solo, formou metanol como produto intermediário do processo de biodegradação, o que tornou o solo muito tóxico após 4 meses sob ação dos micro-organismos do solo. Este efeito tóxico foi muito mais intenso nos primeiros 60 dias de biodegradação.

- O perfil da comunidade bacteriana do solo foi modificado devido a contaminação de misturas diesel/biodiesel.

Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*

Jaqueline Matos Cruz¹ · Cian Hughes² · Brid Quilty³ · Renato Nallin Montagnoli¹ · Ederio Dino Bidoia¹

Received: 13 October 2016 / Accepted: 10 July 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

Abstract The greatest challenge in producing biomolecules at industrial scale is cost. In order to provide cheaper sources, the present study describes the production of biosurfactant using a low-cost medium supplemented with manganese. The feedstock used to produce biosurfactant was crude glycerol, a by-product of biodiesel production. Results showed that 5% (v/v) of glycerol and 0.05 mM of manganese was the best combination to produce biosurfactant. The produced biosurfactant was able to reduce surface tension and showed emulsification activity in diesel fuel. The main functional groups of the biosurfactant were identified by ¹H NMR and FTIR spectra. We identified the molecule as surfactin based on comparison with surfactin standard spectra described in the literature. This study showed conversion of low-value glycerol into value-added products as biosurfactant. The use of a by-product as a carbon source for biosurfactant production is a possible strategy for reducing production costs. In addition, biosurfactant production by *Bacillus subtilis* can be considered safe and commercially viable, because it is a non-pathogenic bacterium.

Keywords Fermentation · Bioproducts · Agriculture · Glycerol · Biodiesel · Biofuels

✉ Ederio Dino Bidoia
ederio@rc.unesp.br

¹ Department of Biochemistry and Microbiology - Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13506-900 Rio Claro, Brazil

² School of Engineering, Dublin City University (DCU), Dublin 9, Ireland

³ School of Biotechnology, Dublin City University (DCU), Dublin 9, Ireland

Introduction

Biosurfactants are complex biomolecules produced by bacteria and fungi. They have important properties including solubility, low critical micelle concentration (CMC) and surface tension reduction [1].

The industrial-scale production of biosurfactants must overcome some challenges, such as low yield, expensive substrates and downstream processing operations that increase production costs. The commercially available biosurfactant surfactin is valued at approximately \$15.3/1 mg. On the other hand, the cost of chemical surfactants is around one dollar/lb, to put it in perspective [2]. Therefore, potential substrates for biosurfactant production have been sought from agro-industrial crops and residues, to provide cheaper and renewable sources for production at industrial scale.

Biodiesel is obtained from triglycerides by a transesterification reaction with methanol. The main by-product from biodiesel production is glycerol. The world biodiesel market might reach 37 billion gallons by 2016 [3]. Consequently, crude glycerol will be increasingly available. Therefore, conversion of this low-value glycerol into value-added products have attracted attention.

The biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* strains consists of a long-chain fatty acid linked in a short peptide moiety composed of seven amino acids. There are natural variations of the surfactin chemical structure [4]. The peptide sequence may change due to substitutions of amino acid in the peptide ring [5–7]. In addition, the length of the fatty acid chain can vary between 13 and 15 carbons [8–10] or least common homologous with 12 and 16 carbons [9, 11, 12]. These homologous can exhibit different properties and activities [13, 14].

The species *B. subtilis* is able to grow in many alternative carbon sources, including agricultural waste and by-products [15]. The supplementation of the medium with metallic ions may induce overproduction of surfactin. Manganese and iron salts added to the culture medium enhances both the biomass and surfactin concentration [16, 17].

This article describes the production of surfactin by *B. subtilis* in a medium with glycerol, a low-cost carbon source, supplemented with manganese salts. The properties of the crude surfactin such as surface tension and emulsification activity were tested. Chemical characterisation of the purified surfactin was obtained using Infrared spectra and ^1H NMR spectra.

Materials and Methods

Growth Conditions of *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ATCC 6633 was grown in Erlenmeyer flasks with 50 mL of nutrient broth and 5% of glycerol. The medium was incubated on a rotary shaker at 180 rpm and 35 °C for 24 h. Afterwards, the culture medium and the cells were separated by centrifugation for 20 min at 1500×g using a K-24 centrifuge. The cells were washed with sterile sodium chloride solution 0.85% (w/v). The inoculum was adjusted by measuring the optical density of 0.35×10^{-1} (1.66 g L^{-1}) at 600 nm and 1 mL was used to inoculate the production medium.

Biosurfactant Production

The culture medium for biosurfactant production was composed of 50 mL of Bushnell-Haas medium. Factors such as glycerol concentration (5, 7 and 9% v/v) and manganese sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 99.6%—Mallinckrodt) concentration were tested to allow higher productivity of biosurfactant. The MnSO_4 was added to the medium to obtain concentrations of 0.01 and 0.05 mM. Bacterial growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (Hach DR/2500 Spectrophotometer). A calibration curve was built to relate the absorbance with cell dry weight. The pH of the production medium was measured after fermentation using a Digimed DMPH-2 pH meter. The flasks were incubated on a rotary shaker at 180 rpm and 35 °C for 72 h. The production of dry crude biosurfactant was calculated using optimum conditions for biosurfactant production.

Biosurfactant Extraction

Bacillus subtilis cells were removed from culture medium by centrifugation at 1500×g for 20 min using a K-24 centrifuge. The cell-free supernatant was subjected to acid

precipitation, according Cooper et al. [18], by the addition of 6 M HCl until the pH reached pH 2.0 and was stored at 4 °C overnight. Crude biosurfactant was recovered by centrifugation at 1500×g for 20 min.

Surface Tension Measurement

Surface tension measurements were performed using a Krüss K6 Tensiometer equipped with a Du Noüy platinum ring. The crude biosurfactant was dissolved in a phosphate buffer pH 7. The surface tension was plotted against concentration of crude biosurfactant to determine the critical micelle concentration (CMC).

Emulsification Index (E_{24})

The ability of the biosurfactant to emulsify liquid such as water and oil fuel was tested. Emulsifying activity was determined by the addition of 2 mL of diesel fuel and the same volume of biosurfactant solution at different concentrations in test tubes. The tubes were then vortexed at maximum speed for 2 min, and the emulsions produced were allowed to settle for 24 h at room temperature. The emulsification index (E_{24}) was calculated as the percentage of the height of the emulsified layer (mm) divided by the total height of the liquid column (mm) [19].

Purification of the Biosurfactant

Crude biosurfactant was purified by column chromatography filled with silica gel 0.03–0.2 mm, 60 A (Acros Organics). The silica was suspended in chloroform/methanol (2:1). The crude biosurfactant (0.5 g) was dissolved in chloroform/methanol (2:1). The column was eluted using solutions with increasing polarities. Chloroform/methanol/ammonium hydroxide solution at a concentration of 28% (v/v) (80:20:4) (v/v/v), chloroform/methanol/ammonium hydroxide 28% (75:25:4) (v/v/v) and chloroform/methanol/ammonium hydroxide 28% (65:35:5) [5]. Fractions were collected and the presence of biosurfactant was detected by thin layer chromatography with ninhydrin solution. The fractions containing the biosurfactant were placed in a flask and the solvent was evaporated under vacuum by a rotary evaporator. The purified biosurfactant was analysed by FT-IR and NMR spectroscopy.

Characterisation with FT-IR Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Fourier transform infrared spectroscopy FT-IR was used to determine the chemical nature of the biosurfactant. The main functional groups of biosurfactant were obtained using an FT-IR spectrometer Shimadzu 8300.

The ^1H NMR spectra of biosurfactant were recorded on a Bruker 600 MHz spectrometer at room temperature operating, 64 scans (with tetramethylsilane as internal standard). Thirty milligrams of purified biosurfactant were dissolved in 0.5 mL deuteriochloroform (CDCl_3). The assignment of the peaks in the ^1H NMR spectra was done according to the literature [8, 9, 17, 20].

Results and Discussion

Effect of Glycerol on Biosurfactant Production

Bacillus subtilis growth in the medium with different concentrations of glycerol is shown in Fig. 1. *Bacillus subtilis* growth was reported in cell dry weight (g L^{-1}) and the pH of the medium was measured after 48 h of incubation at 35 °C. The medium with 5% (v/v) glycerol supported the best *B. subtilis* growth and the pH of the medium was around 6. Higher levels of crude glycerol affected growth and the pH of the medium negatively. The medium with 7 and 9% (v/v) of glycerol strongly inhibited the *B. subtilis* growth. The pH of the medium decreased to around 4 and 5.

Glycerol is a molecule with a strong influence on the osmotic pressure within cells. High levels of glycerol in the medium can cause intracellular modifications in order to guarantee the bacterial adaptation exposed to unfavourable conditions [21]. Hence, in this study the concentration of glycerol greater than 5% in the medium prevented the bacterial growth.

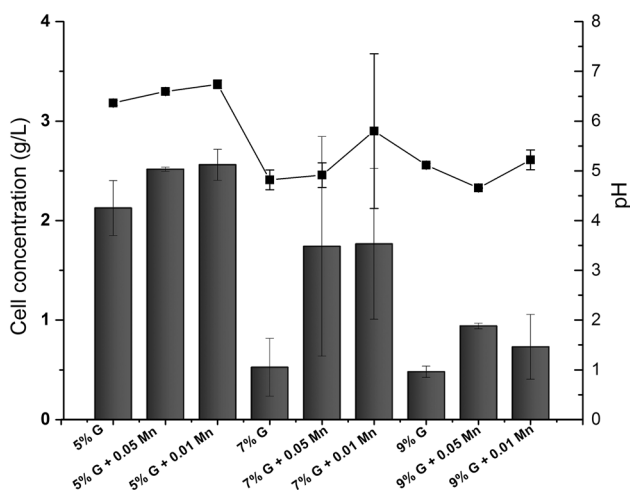


Fig. 1 *Bacillus subtilis* growth in medium with different concentrations of glycerol and manganese (grey bar). Measurement of pH value of medium after 72 h (filled squared with solid line). Error bars values of three independent experiments

The results showed that the addition of 0.01 or 0.05 mM of MnSO_4 in the medium increased microbial growth in all glycerol concentrations, especially in samples with 5% of glycerol. The cell dry weight reached 2.13 g L^{-1} in medium with glycerol 5% (v/v) while the samples with 0.01 and 0.05 mM of MnSO_4 reached 2.56 and 2.52 g L^{-1} , respectively. Therefore, there was no difference in the *B. subtilis* growth between 0.01 and 0.05 mM of MnSO_4 .

Crude Biosurfactant Production

High glycerol concentrations (9% v/v) did not allow growth of the *B. subtilis*. Consequently, it was not possible to recovery any biosurfactant. At the concentrations of 7 and 5% (v/v), the amount of crude biosurfactant produced was 26 and 146 mg/L, respectively. Sousa et al. [22] also used 5% of glycerol in the medium to produce biosurfactant with different strains of *Bacillus*. The acid pH value of the medium at 7 and 9% of glycerol probably interfered with the recovery of biosurfactant because the biosurfactant is not soluble under acidic conditions [15].

The amount of dry crude biosurfactant was highest in the medium containing MnSO_4 . The medium at 5% of glycerol supplemented with 0.01 and 0.05 mM of MnSO_4 produced 740 and 793 mg L^{-1} of crude biosurfactant, respectively. The manganese plays an important role in the surfactin production, because it improves nitrogen metabolism as it promotes synthesis of free amino acid required for surfactin production [23, 24].

Although manganese salts improve the surfactin production, the combination of glycerol and manganese can promote biofilm-associated sporulation [25]. For this, it is important to know which concentration of glycerol and manganese is the best for biosurfactant production. In this study, the addition of 0.05 mM of MnSO_4 improved the biosurfactant production significantly.

The medium with 5% glycerol supplemented with 0.01 and 0.05 mM MnSO_4 achieved superior production when compared with production from a synthetic medium. Al-Wahaibi et al. [26] used *B. subtilis* to produce biosurfactant in minimal medium with different sources of carbon. The yield in minimal medium with glucose and molasses was 300 and 500 mg L^{-1} of biosurfactant, respectively. Liu et al. [14] obtained 692 mg L^{-1} of biosurfactant from LB medium. In this work, the use of a low cost co-product as a source of carbon achieved a maximum production of 793 mg L^{-1} . Therefore, the use of this carbon source might be able to reduce the production costs of the biosurfactant.

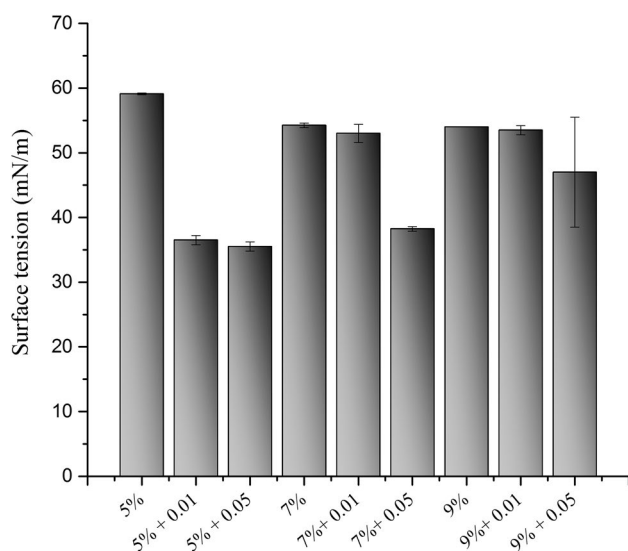


Fig. 2 Surface tension values (mN m^{-1}) obtained in the medium at 5, 7 and 9% (v/v) glycerol after 72 h of incubation. The medium was supplemented with 0.01 and 0.05 mM MnSO_4

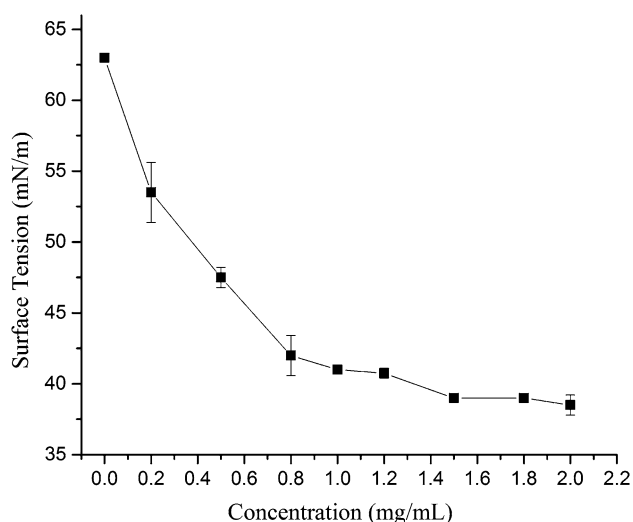


Fig. 3 Surface tension plotted against concentration of crude biosurfactant solution

Surface Tension and Critical Micelle Concentration (CMC)

Surface tension values (mN/m) of the medium at 5, 7 and 9% (v/v) glycerol are shown in Fig. 2. The media with 5% glycerol supplemented with 0.01 and 0.05 mM MnSO_4 were able to reduce the medium surface tension by 39 and 38%, respectively.

The surface tension values at different concentrations of crude biosurfactant are shown in Fig. 3. The crude biosurfactant solution at 0.8 mg mL^{-1} was able to reduce the

buffer surface tension from 63 to 42 mN m^{-1} . Crude biosurfactant solution at 1.5 mg mL^{-1} (1.5 g L^{-1}) reduced the surface tension to 39 mN m^{-1} . The surface tension reduction and CMC value found by Abdel-Mawgoud et al. [27] were 36 mN m^{-1} and 15.3 mg L^{-1} , respectively. These authors suggest that variations in CMC values depends on the purity of the surfactin. The CMC values determined in the present study were from a crude biosurfactant. Thus, it may explain the high value of CMC found in this study. In addition, Liu et al. [28] proposed that the number of carbons of the fatty acids chain influence in the CMC and solubility of the surfactin.

Emulsifying Index (E_{24})

The emulsifying power is another important property of the biosurfactants. The emulsifying index of the crude biosurfactant solution against diesel fuel increased from 23.6 to 33.7%, according to the biosurfactant concentration. The highest emulsifying index was 37.7% at 1.5 mg mL^{-1} of crude biosurfactant solution. Interestingly, concentrations higher than 1.5 did not guarantee high emulsifying index. The crude biosurfactant solution showed properties such as emulsifying power and surface tension reduction that could improve oil recovery processes.

Purification and Chemical Characterisation of the Biosurfactant

The purified biosurfactant obtained from column chromatography showed a retention factor of 0.5. The same value of R_f was reported by Cho et al. [29]. The IR spectra of

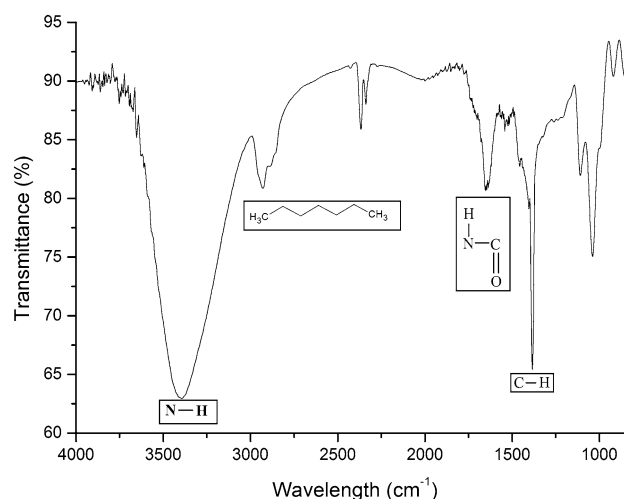


Fig. 4 Infrared spectra of the biosurfactant produced by *B. subtilis*

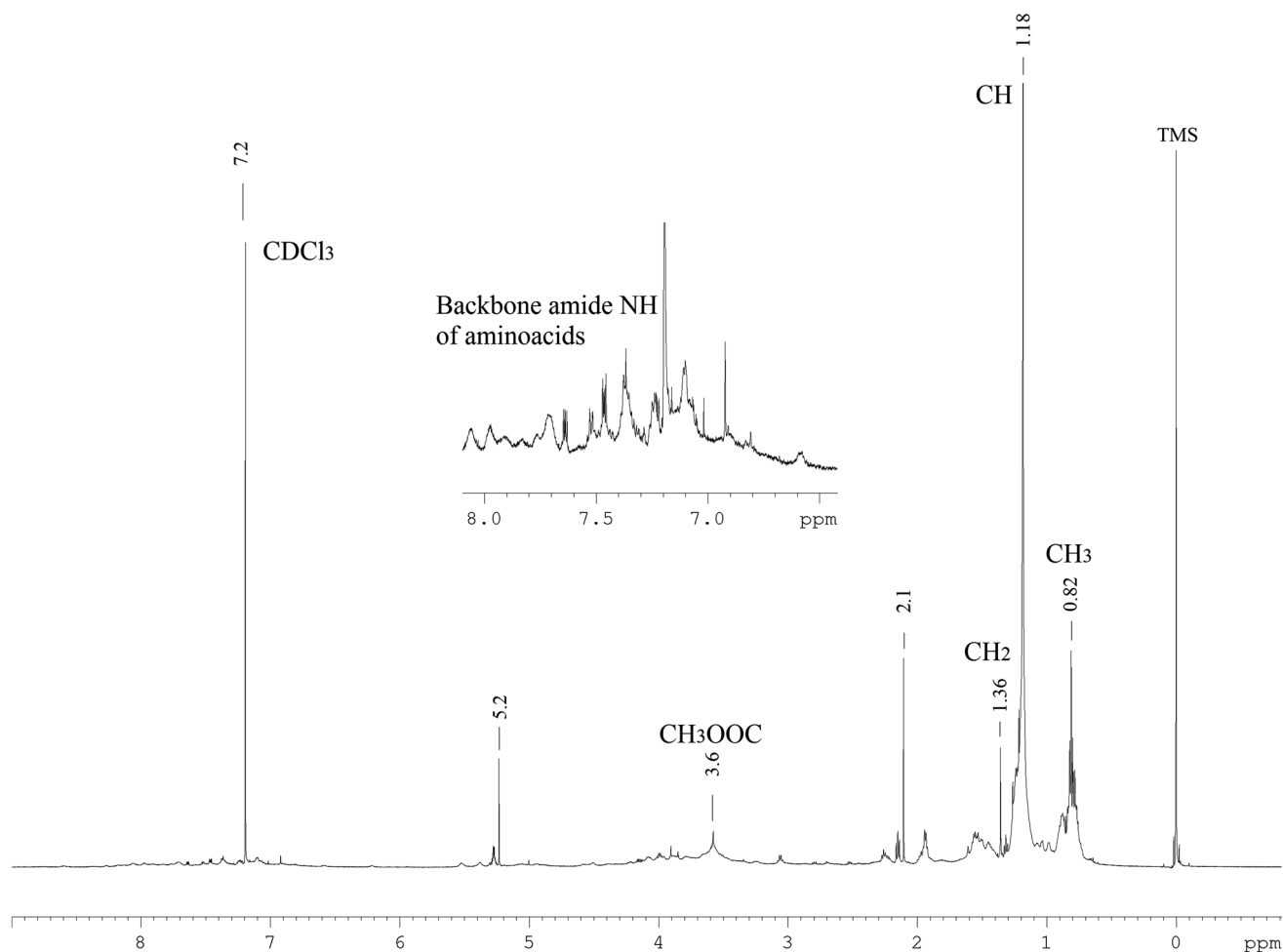


Fig. 5 Nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra of the purified biosurfactant obtained in CDCl_3 at 25°C

the biosurfactant indicates the presence of a peptide component at 3398 cm^{-1} resulting from N–H stretching mode as shown in Fig. 4. Bands at 2933 and 1382 cm^{-1} indicated the presence of an aliphatic chain. The absorbance around 1650 cm^{-1} belonged to C=O stretching vibration of the amide I region [30]. The peak at 1109 is because of C–O–C vibrations in esters [30, 31].

Figure 5 shows the ^1H NMR spectra as well as their assignments. The assigned peaks in ^1H NMR spectra showed similarity among the surfactin spectra described in other studies [5–8, 17–20, 32].

Backbone-amide-NH groups are in the region from $\delta=7.7$ to 7.0 ppm. Signals around $\delta=5.2$ indicated H α from amino acids, which comprise the hydrophilic moiety. The peaks at $\delta=2.1$ – 0.82 ppm confirmed the presence of a long aliphatic chain, the hydrophobic moiety. A methyl ester proton (CH_3OOC) at $\delta=3.6$ ppm was observed. Distinct regions identified by IR and ^1H NMR

spectra presented evidence that the molecule in the study is the biosurfactant, surfactin.

Conclusion

The crude glycerol from a biodiesel refinery can be a low-cost feedstock for biosurfactant production. The production is superior when compared with similar studies using glucose or LB medium as carbon source. In addition, biosurfactant production by *B. subtilis* can be considered as a safe molecule, because this member of the genus *Bacillus* is non-pathogenic. Other benefits of the process include the sustainable use of glycerol and the reduction in production costs of a highly useful product. Also, the biotechnological valorisation of crude glycerol makes biodiesel production more sustainable and economically attractive.

Acknowledgements This work was supported by FAPESP [Grant number 2013/13813-0] and RBI- Research Brazil Ireland.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors have declared no conflict of interest.

References

- Mulligan, C.N.: Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* **133**, 183–198 (2005). doi:[10.1016/j.envpol.2004.06.009](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009)
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M.: Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Exp.* **1**, 1–5 (2011). doi:[10.1186/2191-0855-1-5](https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5)
- Yang, F., Hanna, M.A., Sun, R.: Value-added uses for crude glycerol a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels* **5**, 1–10 (2012). doi:[10.1186/1754-6834-5-13](https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-13)
- Pathak, K.V., Keharia, H.: Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *Biotech* **4**, 283–295 (2014). doi:[10.1007/s13205-013-0151-3](https://doi.org/10.1007/s13205-013-0151-3)
- De Faria, A.F., Teodoro-Martinez, D.S., Barbosa, G.N.O., Vaz, B.G., Silva, Í.S., Garcia, J.S., Tótolá, M.R., Eberlin, M.N., Grossman, M., Alves, O.L., Durrant, L.R.: Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochem.* **46**, 1951–1957 (2011). doi:[10.1016/j.procbio](https://doi.org/10.1016/j.procbio)
- Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., Ziessow, D.: Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J Colloid Interface Sci.* **204**, 1–8 (1998). doi:[10.1006/jcis.1998.5558](https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5558)
- Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J., Ziessow, D.: Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 998–1005 (1991). doi:[10.1016/0006-291X\(91\)90637-M](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90637-M)
- Liu, X.Y., Yang, S.Z., Mu, B.Z.: Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochem.* **44**, 1144–1151 (2009). doi:[10.1016/j.procbio.2009.06.014](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.014)
- Liu, X.Y., Yang, S.Z., Mu, B.Z.: Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *J. Pept. Sci.* **14**, 864–875 (2008). doi:[10.1002/psc.1017](https://doi.org/10.1002/psc.1017)
- Tang, J.S., Gao, H., Hong, K., Yu, Y., Jiang, M.M., Lin, H.P., Ye, W.C., Yao, X.S.: Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR spectral data of nine surfactin isomers. *Magn. Reson. Chem.* **45**, 792–796 (2007). doi:[10.1002/mrc.2048](https://doi.org/10.1002/mrc.2048)
- You, J., Yang, S., Mu, B.: Structural characterization of lipopeptides from *Enterobacter* sp. strain N18 reveals production of surfactin homologues. *Eur. J. Sci. Technol.* **117**, 890–898 (2015). doi:[10.1002/ejlt.201400386](https://doi.org/10.1002/ejlt.201400386)
- Jajor, P., Piłakowska-Pietras, D., Krasowska, A., Łukaszewicz, M.: Surfactin analogues produced by *Bacillus subtilis* strains grown on rapeseed cake. *J. Mol. Struct.* **1126**, 141–146 (2016). doi:[10.1016/j.molstruc.2016.02.014](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.02.014)
- Hazra, C., Kundu, D., Chaudhari, A.: Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity. *RSC Adv.* **5**, 2974–2982 (2015). doi:[10.1039/C4RA13261K](https://doi.org/10.1039/C4RA13261K)
- Liu, Q., Lin, J., Wang, W., Huang, H., Li, S.: Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochem. Eng. J.* **93**, 31–37 (2015). doi:[10.1016/j.bej.2014.08.023](https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.023)
- Nitschke, M., Pastore, G.M.: Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour. Technol.* **97**, 336–341 (2006). doi:[10.1016/j.biortech.2005.02.044](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044)
- Wei, Y.H., Chu, I.M.: Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* **24**, 479–482 (2002)
- Wei, Y.H., Chu, I.M.: Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzym. Microb. Technol.* **22**, 724–728 (1998). doi:[10.1016/S0141-0229\(98\)00016-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00016-7)
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff S.J.B., Kosaric, N.: Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 408–412 (1981)
- Cooper, D., Goldenberg, B. G.: Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 224–229 (1987)
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S.: Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 °C. *J. Surfact. Deterg.* **2**, 367–372 (1999). doi:[10.1007/s11743-999-0091-6](https://doi.org/10.1007/s11743-999-0091-6)
- Szymanowska-Powalowska, D.: The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. *Electron. J. Biotechnol.* **18**, 128–133 (2015). doi:[10.1016/j.ejbt.2015.01.006](https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.006)
- Sousa, M., Melo, V.M.M., Rodrigues, S., Sant'ana, H.B., Gonçalves, L.R.B.: Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**, 897–906 (2012). doi:[10.1007/s00449-011-0674-0](https://doi.org/10.1007/s00449-011-0674-0)
- Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Rodrigues, A.I., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R.: Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front. Microbiol.* **6**, 59 (2015). doi:[10.3389/fmicb.2015.00059](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059)
- Huang, X., Liu, J., Wang, Y., Liu, J., Lu, L.: The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 381–389 (2015). doi:[10.1080/13102818.2015.1006905](https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1006905)
- Shemesh, M., Chai, Y.A.: Combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase kinD signalling. *J. Bacteriol.* **195**, 2747–2754 (2013). doi:[10.1128/JB.00028-13](https://doi.org/10.1128/JB.00028-13)
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B.: Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **114**, 324–333 (2014). doi:[10.1016/j.colsurfb.2013.09.022](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.022)
- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H.: Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **150**, 289–303 (2008). doi:[10.1007/s12010-008-8153-z](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z)
- Liu, Y., Koh, C.M.J., Ji, L.: Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresour. Technol.* **102**, 3927–3933 (2011). doi:[10.1016/j.biortech.2010.11.115](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.115)
- Cho, S.J., Hong, S.Y., Kim, J.Y., Park, S.R., Kim, M.K., Lim, W.J., Shin, E.C., Kim, E.J., Cho, Y.U., Yun, H.D.: Endophytic *Bacillus* sp. CY22 from a balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) produces surfactin isoforms. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 859–865 (2003)
- Shao, C., Liu, L., Gang, H., Yang, S., Mu, B.: Structural diversity of the microbial surfactin derivatives from selective esterification approach. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 1855–1872 (2015). doi:[10.3390/ijms16011855](https://doi.org/10.3390/ijms16011855)
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R.: Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1675–1684 (2008). doi:[10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x)
- Pereira, J.F.B., Gudiña, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J.A., Coutinho, J.A.P., Rodrigues, L.R.: Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* **111**, 259–268 (2013). doi:[10.1016/j.fuel.2013.04.040](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040)