

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 15/12/2018.


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

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DA MISTURA
DIESEL/BIODIESEL**

GABRIELA MERCURI QUITERIO

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).

Novembro/2017



AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DA MISTURA DIESEL/BIODIESEL

GABRIELA MERCURI QUITERIO

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).

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Novembro/2017

620.1122 Quiterio, Gabriela Mercuri

Q8a Avaliação da biodegradação da mistura diesel/biodiesel / Gabriela Mercuri Quiterio. - Rio Claro, 2018
113 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Biodegradação. 2. Biodegradação de combustíveis. 3. Bacillus subtilis. 4. Surfactante. 5. Respirimetria. 6. Diesel. 7. Biodiesel. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

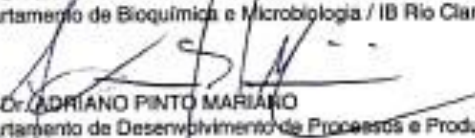
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA MISTURA DIESEL/BIODIESEL POR COLORIMETRIA


AUTORA: GABRIELA MERCURI QUITERIO

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. ADRIANO PINTO MARIANO
Departamento de Desenvolvimento de Processos e Produtos / UNICAMP


Prof. Dra. REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP


Prof. Dra. SANDRA IMACULADA MAINTINGUER
x / Instituto de Pesquisa em Bioenergia


Prof. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 15 de dezembro de 2017

Título alterado para: "Avaliação da biodegradação da mistura diesel/biodiesel"

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luis Eduardo e Cleonice pelo amor incondicional, pelos valores ensinados e pelo apoio em minhas decisões;

Às minhas irmãs Giovana e Giuliana por estarem sempre prontas a me ouvirem e ajudarem no que for preciso;

Aos meus sobrinhos Sophia, Enrico, Pietro e Augusto por tornarem minha vida incrivelmente mais leve e feliz;

Ao Prof^o Dr. Ederio Dino Bidoia pela orientação neste trabalho;

Às professoras Brid Quilty do departamento de Biotecnologia e Mary Pryce do departamento de Química da Dublin City University e toda sua equipe por me receberem tão bem em seus laboratórios;

Ao pessoal do Lab. Multi. que se tornaram grandes amigos: Erica Almeida, Rubens Moraes, Marina Turini, Jaqueline Cruz, Guilherme Dilarri, Carolina Mendes, Vinícius da Silva e Renato Montagnolli, foi um enorme prazer conhecer e conviver com vocês;

Aos técnicos Beto e Adriano por toda ajuda durante realização de meus experimentos;

Ao Prof. Dr. André Rodrigues por permitir o uso de seu laboratório para análises de PCR e à Lorena Lacerda por toda a ajuda com as análises;

Aos Prof. Dr. Marcio Lambais e Dr. Fernando Andreote do Departamento de Ciências do Solo da ESALQ por me receberem e permitirem utilização de seus laboratórios;

À CAPES, CNPq e PRH-05/Petrobrás pelo apoio financeiro;

Aos meus amigos Rafael, Tammy e Tracy pelas inúmeras visitas em Rio Claro, tornando essa etapa de minha vida muito mais feliz e divertida;

À Marta, Paula e Natália, companheiras de novas aventuras e experiências, por todas as horas de conversas, pelo apoio, e por toda diversão e risadas;

Ao Marc por toda ajuda, carinho e apoio;

A todos os alunos e professores do departamento que de alguma forma estiveram presentes durante meu doutorado.

RESUMO

A projetada escassez de combustíveis fósseis, a alta necessidade energética e as pressões ambientais tornaram necessária uma mudança na matriz energética mundial. Nesse sentido, verifica-se a expansão do mercado de combustíveis derivados de fontes renováveis, predominando o etanol para automóveis e o biodiesel adicionado ao diesel para caminhões, ônibus, tratores e transportes marítimos. Além de diversificar a matriz energética, o biodiesel apresenta algumas vantagens do ponto de vista ambiental em relação ao diesel de petróleo como por exemplo, maior biodegradabilidade. Acidentes ambientais com petróleo e derivados causam danos consideráveis ao meio ambiente, gerando uma preocupação pública enorme, que pressiona para soluções rápidas e econômicas. Dentre as alternativas de tratamento para quando ocorre um derramamento de petróleo, a biorremediação emerge como um processo simples e de baixo custo quando comparado a outras alternativas, além de ser menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodegradação de misturas de diesel e biodiesel nas proporções de 3, 5, 7, 10, 25, 50 e 80% em solo e em meio aquoso, verificando se a adição de inóculo da bactéria *Bacillus subtilis* e a adição do surfactante químico Tween[®] 80 auxilia na biodegradação de tais misturas. Também foi analisada, para as misturas de 5, 25 e 50% de biodiesel em diesel, a eficiência do processo de biorremediação, a fitotoxicidade e a diversidade da comunidade microbiana. Com os resultados obtidos em testes de respirometria de Bartha e Pramer, 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP) e do teste da atividade microbiana com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) foi demonstrado que existe uma correlação entre a quantidade de biodiesel adicionado ao diesel e a atividade microbiana encontrada nas amostras, sendo esta maior com a maior quantidade de biodiesel adicionado. O teste de *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) demonstrou que houve uma seleção da microbiota presente nos solos contendo as misturas, sendo muito semelhantes as microbiotas das misturas de 25 e 50% de biodiesel em diesel. Também foi demonstrado que a adição do inóculo de *B. subtilis* e do surfactante interferem na biodegradação das misturas, sendo que possuem diferentes resultados para cada mistura de biodiesel em diesel testada. A maior quantidade de biodiesel nas misturas causou maior fitotoxicidade para as sementes de *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* e *Eruca sativa*.

Palavras-chaves: *Bacillus subtilis*, surfactante, respirometria, diesel, biodiesel, fitotoxicidade.

ABSTRACT

The shortage of fossil fuels, high energy requirements and environmental pressures have made it necessary to change the world energy matrix. In this sense, there is the expansion of the market of fuels derived from renewable sources, predominating ethanol for automobiles and biodiesel for trucks, buses, tractors and maritime transport. In addition to diversifying the energy matrix, biodiesel has some advantages from an environmental point of view in relation to petroleum diesel, such as higher biodegradability. Environmental accidents with oil and by-products cause considerable damage to the environment, generating a huge public concern, pushing for quick and cost-effective solutions. Among the treatment alternatives for when an oil spill occurs, bioremediation emerges as a simple and low-cost process when compared to other alternatives, as well as being less aggressive and more adequate to maintain the ecological balance. The objective of this work was to evaluate the biodegradation of diesel and biodiesel mixtures in the proportions of 3, 5, 7, 10, 25, 50 and 80% of biodiesel in diesel in soil in aqueous medium, checking if the addition of strains of *Bacillus subtilis* and the addition of the chemical surfactant Tween® 80 assists in the biodegradation of such mixtures. The efficiency of the bioremediation process regarding microbial metabolism, ecotoxicity and diversity of the microbial community was also analyzed for blends of 5, 25 and 50% biodiesel in diesel. With the results obtained in Bartha and Pramer respirometry tests, 2,6 dichlorophenol-indophenol (DCPIP), the microbial activity test with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) to mixtures of 5, 25 and 50% of biodiesel in diesel, it was shown that there is a correlation between the quantity of biodiesel added to diesel and the the microbial activity found in the samples. It has also been shown that the addition of the *B. subtilis* inoculum and the surfactant interferes with the biodegradation of the mixtures, and they act differently for each diesel biodiesel mixture tested. The higher amount of biodiesel in the mixtures caused higher phytotoxicity for the seeds of *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* and *Eruca sativa*.

Key-words: *Bacillus subtilis*, surfactant, respirometry, fuels, fitotoxicity.

Lista de Figuras

Figura 1. Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional).....	15
Figura 2. Processo de obtenção do biodiesel por transesterificação.....	16
Figura 3. Evolução anual da produção da produção de biodiesel no país.	17
Figura 4. Reação de redução do DCPIP	19
Figura 5. Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer	21
Figura 6. Dados de absorvância em função da concentração de DCPIP com $R^2 = 0,999$	30
Figura 7. Retra padrão da produção de trifetilformazam (TPF) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	32
Figura 8. Estado oxidado (a) e reduzido (b) do 2,6-diclorofenol-indofenol.....	42
Figura 9. Teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo as misturas de biodiesel e diesel	44
Figura 10. Valores da última leitura realizada em 144 h do teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo as misturas de biodiesel e diesel.....	45
Figura 11. Teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo diesel e as misturas de 3; 5, 7 e 10% de biodiesel em diesel	46
Figura 12. Teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo diesel e as misturas de 25; 50 e 80% de biodiesel em diesel	48
Figura 13. Teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo as misturas de biodiesel e diesel em solo	50
Figura 14. Valores da última leitura realizada em 22 h do teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo as misturas de biodiesel e diesel em solo	51
Figura 15. Teste de descoloração do indicador DCPIP dos ensaios contendo as misturas de biodiesel e diesel em solo	52
Figura 16. Teste de descoloração do indicador DCPIP realizada em frasco Erlenmeyer para melhor oxigenação das amostras amostras B5b, B5bs, B25b, B25bs, B50b, B50bs no: (a) Tempo 0, (b) Tempo 4, (c) Tempo 17, (d) Tempo 22, (e) Tempo 29, (f) Tempo 71.....	54
Figura 17. Teste de biodegradação em respirômetro de Bartha e Pramer	56
Figura 18. Teste de biodegradação em respirômetro de Bartha e Pramer. (a) B5, (b) B25, (c) B50 e (d) B5, B25, B50 puras	57

Figura 19. Modelagem do modelo de Membré para previsão da produção de CO ₂ para os ensaios B5, B25 e B50.....	61
Figura 20. Modelagem do modelo de Membré para previsão da produção de CO ₂ para os ensaios B5b, B25b e B50b.....	62
Figura 21. Modelagem do modelo de Membré para previsão da produção de CO ₂ para os ensaios B5s, B25s e B50s	63
Figura 22. Modelagem do modelo de Membré para previsão da produção de CO ₂ para os ensaios B5bs, B25bs e B50bs	64
Figura 23. Índice de germinação de semente de <i>L. sativa</i> para os ensaios contidos nos respirômetros.....	68
Figura 24. Índice de germinação de semente de <i>C. sativus</i> para os ensaios contidos nos respirômetros.....	70
Figura 25. Índice de germinação de semente de <i>C. sativus</i> para os ensaios contidos nos respirômetros.....	72
Figura 26. Atividade da desidrogenase do Controle Solo e solos contaminados com as misturas B5, B25 e B50. T0: tempo inicial, T30: após 30 dias e T60: após 60 dias. As barras de erro representam o desvio padrão (replica = 3).....	77
Figura 27. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias dos solos contidos nos ensaios de respirometria de Bartha e Pramer ao final da biodegradação. O gráfico corresponde ao número de UFC em meio plate count agar (PCA) e diluição 10 ⁻⁵	80
Figura 28. Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos dos solos contidos nos ensaios de respirometria de Bartha e Pramer ao final da biodegradação. O gráfico corresponde ao número de UFC em meio sabouraud e diluição 10 ⁻³	81
Figura 29. Gel de agarose com as bandas de DNAs obtidos dos solos após o processo de biodegradação	83
Figura 30. Perfil de bandas oriundos da reação de PCR usando o marcador 16DNAr para bactérias totais.....	84
Figura 31. Correlação das amostras com base nos perfis de DGGE obtido com iniciadores para os grupos bactérias totais.....	85
Figura 32. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis de DGGE de bactéria total.....	86

Figura 33. Cromatogramas de Biodiesel em a) Tempo Inicial e b) após 7 dias de biodegradação
..... 88

Lista de Tabelas

Tabela 1. Misturas de biodiesel em diesel preparadas em laboratório.....	25
Tabela 2. Composição dos testes colorimétricos	27
Tabela 3. Composição dos testes colorimétricos em amostras de solo.....	28
Tabela 4. Quantificação dos compostos do teste colorimétrico contendo solo	29
Tabela 5. Diluições de DCPIP e leitura em absorvância 600 nm para obtenção da reta padrão .	30
Tabela 6. Composição respirômetros.....	33
Tabela 7. Valores utilizados para a elaboração da reta padrão de KOH e respectivos valores correspondentes em mg de CO ₂	35
Tabela 8. Síntese dos resultados dos tratamentos para as misturas de diesel/biodiesel.....	49
Tabela 9. CO ₂ acumulado em mg/50g no último dia de ensaio (subtraído os valores de CSolo)	58
Tabela 10. Análise química do solo utilizado nos respirômetros e no teste de colorimetria	59
Tabela 11. Resultados da modelagem cinética	65
Tabela 12. Análises estatísticas dos testes de fitotoxicidade com L. sativa, C. sativus e E. sativa para as amostras puras (sem inóculo e sem surfactante).....	74
Tabela 13. Análises estatísticas dos testes de fitotoxicidade com L. sativa, C. sativus e E. sativa para as amostras contendo inóculo de B. subtilis	74
Tabela 14. Análises estatísticas dos testes de fitotoxicidade com L. sativa, C. sativus e E. sativa para as amostras contendo surfactante	74
Tabela 15. Análises estatísticas dos testes de fitotoxicidade com L. sativa, C. sativus e E. sativa para as amostras contendo inóculo de B. subtilis e surfactante	75
Tabela 16. Produção de CO ₂ em 30 e 60 dias, Medida da Atividade Desidrogenase em 0, 30 e 60 dias	78
Tabela 17. pH do solo contido nos frascos e mantidos a 28 °C por 120 dias	79
Tabela 18. Umidade do solo contido nos frascos e mantidos a 28 °C por 120 dias.....	82

Sumário

1. Introdução	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Diesel.....	14
2.2 Biodiesel.....	14
2.3 Biodegradação de Diesel e Biodiesel.....	17
2.4 Método colorimétrico.....	18
2.5 Respirometria	20
2.6 Surfactantes	21
2.6.1 Surfactantes químicos	21
2.6.2 Biossurfactantes	22
2.7 Biodegradação e toxicidade	23
2.8 Teste da atividade microbiana com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos Gerais.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAL	24
4.1 Diesel.....	24
4.2 Biodiesel.....	24
4.3 Misturas Diesel e Biodiesel.....	25
4.3 Teste da atividade microbiana com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP)	25
4.4 Organismos testes para ensaio de toxicidade	25
5. MÉTODOS	26
5.1 Atividade Microbiana.....	26
5.1.1 Teste da atividade microbiana com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP)	26

5.1.1.1 Análise quantitativa.....	26
5.1.1.2 Análise qualitativa.....	30
5.1.2 Teste da atividade microbiana com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)	31
5.2 Teste qualitativo do DCPIP.....	32
5.3 Atividade Respirométrica.....	32
5.4 Modelagem matemática	36
5.6 Teste de toxicidade.....	37
5.7 Quantificação da microbiota	38
5.8 pH do solo	39
5.9 Umidade do Solo.....	39
5.10 Screening da comunidade microbiana.....	39
5.10.1 Extração de DNA dos solos após teste de respirometria.....	39
5.10.2 Amplificação do gene 16S rRNA	40
5.10.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE.....	41
5.11 Análise da biodegradação do biodiesel por Cromatografia Gasosa.....	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Teste da atividade microbiana com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP)	42
6.1.1 DCPIP Solo	50
6.1.2 Teste Qualitativo do DCPIP.....	53
6.2 Respirômetros de Bartha e Pramer.....	55
6.2.1 Modelo de cinética em resultados de evolução de CO ₂	60
6.3 Resultados dos testes de fitotoxicidade.....	67
6.3.1 Resultados dos testes de fitotoxicidade com <i>L. sativa</i>	67
6.3.2 Resultados dos testes de fitotoxicidade com <i>C. sativus</i>	69
6.3.3 Resultados dos testes de fitotoxicidade com <i>E. sativa</i>	71

6.4 Teste da atividade microbiana com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)	76
6.5 pH do solo	78
6.6 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no solo no tempo final	79
6.7 Umidade Final do Solo.....	82
6.8 Screening da comunidade microbiana	83
6.8.1 Extração de DNA	83
6.8.2 Amplificação de genes específicos do DNA.....	84
6.8.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE.....	85
6.9 Análise da biodegradação do biodiesel por Cromatografia Gasosa.....	87
7. Conclusões	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
9. ANEXO.....	101

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento do preço do petróleo bruto, as projetadas diminuições de seu fornecimento no futuro próximo e a contaminação ambiental devido à combustão e aos derrames acidentais de seus derivados, o desenvolvimento de combustíveis alternativos estão recebendo grande notoriedade. Um desses combustíveis é o biodiesel, que no Brasil sua adição ao diesel tornou-se obrigatória em 2008.

O óleo diesel é o combustível derivado de petróleo mais consumido no Brasil, sendo o principal na matriz energética nacional. É formado por uma mistura complexa de compostos não aquosos e hidrofóbicos como alcanos e hidrocarbonetos de cadeia ramificada. O biodiesel é um combustível derivado de óleos vegetais ou animais e possui propriedades similares às do petrodiesel, sendo possível realizar misturas desses combustíveis e utilizá-las em automóveis sem necessidade de adaptação dos motores.

Um grande problema ambiental relacionado aos combustíveis refere-se aos processos de transporte e armazenamento dos mesmos, onde podem ocorrer derrames provocando a contaminação do solo e águas superficiais e subterrâneas. Quando em contato com o ambiente, os derivados de petróleo possuem lenta biodegradação, pois constituem-se de molecular apolares, ou seja, hidrofóbicas.

A modificação dessa propriedade pode ser realizada por tensoativos, como o surfactante não iônico Tween[®] 80, resultando na dissolução destas substâncias em água, e assim, possibilitando sua biodegradação por micro-organismos (ROCHA, 2006; GRIPPA et al., 2010). Um dos micro-organismos conhecidos pela realização da biodegradação de combustíveis é a bactéria *Bacillus subtilis*, que têm demonstrado bons resultados na descontaminação de ambientes em casos de derramamentos (CUBITTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2000).

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a biodegradação de diferentes misturas de biodiesel em diesel, e a ação do surfactante Tween[®] 80 e da bactéria *Bacillus subtilis* na biodegradação de diferentes misturas diesel/biodiesel.

7. CONCLUSÕES

- De acordo com os testes de respirometria de Bartha e Pramer, DCPIP e do teste de desidrogenase concluiu-se que existe uma correlação entre a quantidade de biodiesel adicionado ao diesel e o aumento da atividade microbiana.
- A partir da mistura B25 que há maior biodegradação das misturas de diesel e biodiesel que em diesel puro.
- A B25 obteve o melhor resultado de biodegradação entre todas as misturas testadas.

- A ação do surfactante favoreceu as misturas B5, B7 e B10 e prejudicou as misturas B25, B50 e B80.
- A adição do inóculo e surfactante juntos ocasionaram rápida descoloração do DCPIP e grande proliferação de bactérias.
- A maior quantidade de biodiesel causou maior fitotoxicidade para as sementes de *L. sativa*, *C. sativus* e *E. sativa*.
- A atividade da desidrogenase forneceu uma informação rápida sobre o impacto das misturas na atividade da microbiota do solo, confirmando os resultados obtidos nos ensaios respirométricos.
- A modelagem cinética proporcionou o tempo máximo de biodegradação das amostras.
- A seleção da microbiota do solo pela adição dos combustíveis determinou a taxa de biodegradação das amostras.
- Segundo resultados obtidos nas análises de respirometria e de DGGE, nas amostras B5 e B25 ocorre uma seleção de microbiota que se assemelham e, assim, possuem próximas taxas de biodegradação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, G. & DUNCAN, H. Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363–370, 2002.

AGBOGIDI, O.M.; ERUOTOR, P.G.; AKPAROBI, S.O.; NNAJI, G.U. Evaluation of crude oil contaminated soil on the mineral nutrient elements of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agronomy**, v. 6, p. 188–193, 2007.

ALBUQUERQUE, A.F. **Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando micro-organismos do solo**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, Área de concentração Saneamento, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 99p, 2000

ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Michigan: Academic Press, 1995. p. 228-230.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 302f. Academic Press, 1994.

AMAKIRI, J.O.; ONOFEGHARA, F.A. Effects of crude oil on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. **Environmental Pollution**, v. 35, p. 159-167, 1984.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAH polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, p. 401–412, 2004.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>> acesso em março de 2017.

ATABANI, A.E.; SILITONGA, A.S.; BADRUDDIN, I.A.; MAHLIA, T.M.I.; MASJUKI, H.H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 16, p. 2070-2093, 2012.

BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JUNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-412, 2007.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C.; VISCARDI, S.L.; MENENDEZ, A.; DARODA, R. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. **Revista Biodiesel**, v. 4, p. 24-26, 2006.

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

BIDOIA, E.D.; MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 2, A. Méndez-Vilas, p. 1277-1288, 2010.

BIK, H.M.; HALANYCH, K.M.; SHARMA, J.; THOMAS, W.K. Dramatic shifts in benthic microbial eukaryote communities following the Deepwater Horizon oil spill. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 2012.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v. 86, p. 2596-2602, 2007.

BOUTIN, S.R., ANSARI, H., CONCIBIDO, V., DENNY, R., ORF, J.; YOUNG, N.D. RFLP analysis of cyst nematode resistance in soybean. **Soybean Genetics Newsletter** 19: 1993, 123-127.

BOWERS, N.; PRATT, J.R.; BEESON, D.; LEWIS, M. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Elmsford, v. 16, p. 207-213, 1997.

BRAKSTAD O.G.; THRONE-HOLST, M.; NETZER, R.; STOECKEL, D.M.; ATLAS, R.M. Microbial communities related to biodegradation of dispersed Macondo oil at low seawater temperature with Norwegian coastal seawater. **Microbial Biotechnology**, v.8, p. 989–998, 2015.

BROCK, T.D. & MADINGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**, 6th edition. Prentice-hall, New Jersey, 1991.

CALDWELL, D.R. **Microbial physiology and metabolism**. 2nd. Star, Belmont, 2000. - pdf Colla diesel/biodiesel DGGE.

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

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 207-228, 2009.

CETESB - Companhia de Tecnologia Saneamento Ambiental. Contagem em placas de bactérias heterotróficas. **L5. 201**-São Paulo, Dez/1986.

CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma Técnica L6.350, Cetesb: São Paulo, 15 pp., 1990.

CHAPELLE, F.H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 477 p.

CHEMLAL, R., TASSIST, A., DROUCHE, M., LOUNICI, H., DROUCHE, N., MAMERI, N. Microbiological aspects study of bioremediation of diesel-contaminated soils by biopile technique. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 201–206, 2012.

CHESNEAU, H.L. The silent fuel killers (Stability and Microbiologicals). In: Proceedings of international joint power generation conference. p. 1-8, 2000.

CHEUNG, W.Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B.S. A simple and rapid DNA micro extraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications**, v. 3, p. 60-70, 1989.

CUBITTO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; SCHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.; SÍÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, v. 15, p. 281-287, 2004.

CRUZ, J.M. **Avaliação Ecotoxicológica da Biodegradação Utilizando Inóculo Enriquecido com *Bacillus subtilis* em Solo Contaminado com Petróleo, Diesel e Biodiesel**. 2013. 65 f. dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro – Universidade Estadual: [s.n.].

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. Artificial and natural substrates: D. substrates for phosphatases. In: Dawson RMC, ed. **Data for Biochemical Research**, p. 352-3, 1986.

DEMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. **Marine Pollution Bulletin**, v.54, p. 894-904, 2007.

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

DÍAZ, E. Degradação bacteriana de poluentes aromáticos: um paradigma de versatilidade metabólica. **International Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 173-180, 2004.

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

DUTTON, J.A. **Alternative Fuels from Biomass Sources**. The Reaction of Biodiesel: Transesterification.

ERIKSSON, M.; SWARTLING, A.; DALHAMMAR, G.; FÄLDT, J.; BORG-KARLSON, A.K. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 50, p 129–134, 1998.

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.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, P.; VILA, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; GRIFOLL, M.; LEMA, J.M. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 1523-1531, 2006.

FETTER, C.W. **Contaminant Hydrogeology**. New York: Macmillan, 1993.

FIÚZA, A.M.A.; VILA, M.C.C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, v. 31, n. 2, p. 179-183, 2004.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GALLEGO, J.L.R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Biorremediação de solos contaminados com diesel: Avaliação de potencial in situ técnicas by estudo de degradação bacteriana **Biodegradação**, v.12, p. 325-335, 2001.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I.S.; CASTRO, V.D.; CARVALHO J.R.M. Biodiesel de Soja – Reação de Transesterificação para Aulas Práticas de Química Orgânica. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1369-1373, 2007.

GRIPPA, G.A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Estudo genotóxico do surfactante Tween® 80 em *Allium* cepa. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n 1-2, p. 11-16. 2010.

GUERRA, R.C.; ANGELIS, D.F. Classificação e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário. **Arquivos do Instituto Biológico**, 72 (1), p. 87-91, 2005.

HAMAMURA, N.; OLSON, S.H.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils. **Applied Environmental Microbiol**, v. 72, p. 6316–6324, 2006.

HAMDAN, L. J. & FULMER, P.A. Effects of COREXIT (R) EC9500A on bacteria from a beach oiled by the deepwater horizon spill. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 101–109, 2011.

HANSON, K.G.; DESAI, J.D., DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745–748, 1993.

HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 63-70, 1999.

HARRIS, F.S. & ROBINSON, J.S. Factors affecting the evaporation of moisture from the soil. **Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 439-461, 1916.

HAWROT-PAW, M.; MARTYNUS, M. The influence of diesel fuel and biodiesel on soils microbial biomass. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, p. 503–507, 2011.

HEAD, I.M.; JONES, D.M.; RÖLING, W.F. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 173-182, 2006.

HENNER, P.; SCHIAVON, M.; DRUELLE, V.; LICHTFOUSE, E. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. **Organic Geochemistry**, v. 30, p. 963-969, 1999.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HUTCHINS, S.R.; SEWELL, G.; KOVACS, D.; SMITH, G. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. **Environmental Science Technonology**, v. 25, p. 68-76, 1991

IEA – **International Energy Agency**, 2011. Disponível em < www.iea.org/stats/index.asp >. Acesso em: setembro 2013.

JENNINGS, E.M.; TANNER, R.S. Biosurfactant-producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. In: **Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research**, p. 299-306, 2000.

JUNIOR, J.S.; MARIANO, A.P.; De ANGELIS, D.F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 2774-2778, 2009.

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

KANALY, R.A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; SHIGEAKI, H. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4205-4211, 2000.

KARMAKAR, A.; KARMAKAR, S.; MUKHERJEE, S. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.101, n. 19, p. 7.201–7.210, 2010.

KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 204–211, 2006.

KOSTKA, J.E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W. A.; GREEN, S.J., FREYER, G.; 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, n. 22, p. 7962- 7974, 2011.

KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, S.; KUBO, M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, p 749-757, 2008.

LABOURIAU, L.G. & AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n. 1, p. 37-56, 1987.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BÜLL, R.C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (eds.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 4, p. 44-84, 2005.

LAMENDELLA, R.; STRUTT, S.; BORGLIN, S.; CHAKRABORTY, R.; TAS, N.; MASON, O.U.; HULTMAN, J.; PRESTAT, E.; HAZEN, T.C.; JANSSON, J.K. Assessment of the Deepwater Horizon oil spill impact on Gulf coast microbial communities. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1928–1940, 2014.

LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P.; REBZDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, v. 142, p. 432-437, 2006.

LEUNG, D.Y.C., KOO, B.C.P., GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 250-256, 2006.

LINDSTROM & BRADDOCK. Biodegradation of petroleum hydrocarbons at low temperature in the presence of the dispersant Corexit 9500. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 739-747, 2002.

LOPES, P.R.M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2014. 184 f. dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro – Universidade Estadual: [s.n.].

MA, F. & HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MAILA, M.P.; CLEOTE, T.E. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 50, p. 107-113, 2002.

MANCERA-LÓPEZ, M.E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; BARRERA-CORTÉS, J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 151-160, 2008.

MARGESIN, R.; HAMMERLE, M.; TSCHERKO, D. Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil-Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 259-269, 2007.

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de Doutorado, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, 162p, 2006.

MARIANO, A.P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D.M. Monitoramento de indicadores geoquímicos de biorremediação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n.3, p. 296-304, 2007.

MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F.; PIROLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. Biodegradability of comercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 133-142, 2008b.

MARIANO, A.P.; TOMASELE, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; CONTIEIRO, J.; ANGELIS, D.F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology** 7, p. 1323-1328, 2008a.

MELLO, G. S. L. **Avaliação da viabilidade da utilização do teste respirométrico de Bartha para determinar a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares em solo tropical: caso do Fenantreno.** Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. 191p, 2005.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE C. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristic of graminoids. **Environmental Pollution**, v.138, p. 86–91, 2005.

MEYER, D.D.; BEKER, S.A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M.C.R.; FRAZZON, A.P.G.; OSTI, J.F.; ANDREAZZA, R., CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.: Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.95, p.356-363, 2014.

MOESKOPS, B.; BUCHAN, D.; SUKRISTIYONUBOWO.; NEVE, S.D.; GUSSEME, B.D.; WIDOWATI, L. R.; SETYORINI, D.; SLEUTEL, S. Soil quality indicators for intensive vegetable production systems in Java. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 218- 226, 2012.

MONTAGNOLI, R.N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.** 2011. 245 f. dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro – Universidade Estadual: [s.n.].

MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M.; BIDOIA, E.D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 63, p. 297-305, 2009.

MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M.; CRUZ, J.M.; CLARO, M.T.; QUITERIO, G.M.; BIDOIA, E.D. Metabolical shifts towards alternative BTEX biodegradation intermediates induced by perfluorinated compounds in firefighting foams. **Chemosphere**, v. 173, p. 49-60, 2017.

MORALES, G.C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.** México: IMTA. 189p. 2004.

MOREIRA, F.M. & SIQUEIRA, O.J. **Microbiologia e bioquímica do solo** – 2^a ed. Atual. e. Ampl-Lavras: Editora UFLA, 729 p. 2006.

MUDGE, S.M. & PEREIRA, G. Stimulating the biodegradation od crude oil with biodiesel preliminary results. **Spill Science & technology Bulletin**, v.5, n.5, p. 353-355, 1999.

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

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 14, p. 372-378, 2009.

NASSIF, S.M.L.; VIEIRA, I.G.; FERNADES, G.D. (LARGEA/). Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. Piracicaba: IPEF/LCF/ESALQ/USP, **Informativo**

Sementes IPEF, Abr-1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/sementes/>>, acesso em setembro de 2013.

NUVOLARI, A. **Aplicação de Lodo de Esgotos Municipais no Solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia Civil - Universidade Estadual de Campinas, 1996.

NWAOGU, L.A.; ONYEZE, G.O.C.; NWABUEZE R.N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. **African Journal Biotechnology**. v. 7, n. 12, p. 1939-1943, 2008.

OECD. Organization for economic co-operation and environment aerobic and anaerobic transformation in soil. Guideline for testing of chemicals – 307, p. 17, 2002.

OGBO, E.M. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 250-253, 2009.

OLIVEIRA, N.L.; COMMENDATORE, M.G.; MORÁN, A.C.; ESTEVES, J.L. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 70-73, 2000.

OLLIVIER, B. & MAGOT, M. **Petroleum Microbiology**. ASM Press, Washington, 2005.

OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.K.; HEIPIEPER, H.J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1497-1500, 2009.

PASQUALINO, J.C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 874-879, 2006.

PASSMANN, F.; DOBRANICK, J.K. **Relative biodegradability of B100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON STABILITY, HANDLING AND USE OF LIQUID FUELS, 9, 2005. Proceedings... Espanha, Setembro, p.18-22, 2005.

PETERSON, C.L. & HISTRULID, T. Carbon Cycle for Rapeseed Oil Biodiesel Fuels. **Biomass and Bioenergy**, v.14, n.2, p.91-101, 1998.

PETERSON, C.L.; MOLLER, G. Biodiesel fuels: Biodegradability, biological and chemical oxygen demand, and toxicity. In **The Biodiesel Handbook**, ed. G. Knothe, J. Van Gerpen and J. Krahl. Urbana, Illinois: AOCS Press 2005;14:91-101.

POHL, C.H.; KOCK, J.L.F.; THIBANE, V.S. Antifungal free fatty acids: A Review. In: A. MENDEZ-VILAZ (Ed.). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 1 ed. [s.l.] **FORMATEX**, 2011. P. 61-71.

PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n. 8, p.1446-1451, 2008.

RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M. e THAHIRA, J. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**., v. 81, p.25-32, 2002.

RAHSEPAR, S.; SMIT, M.P.J.; MURK, A.J.; RIJNAARTS, H.H.M.; LANGENHOFF, A.A.M. Chemical dispersants: Oil biodegradation friend or foe?. **Marine Pollution Bulletin**, v.108, p. 113–119, 2016.

ROCHA, M.V.P.; OLIVEIRA, A.H.S.; SOUZA M.C.M.; GONÇALVES, L.R. Natural cashew apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.1295-1299, 2006.

RODRIGUEZ-R, L.M.; OVERHOLT, W.A.; HAGAN, C.; HUETTEL, M.; KOSTKA, J.E.; KONSTANTINIDIS, K.T. Microbial community successional patterns in beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. **The ISME journal**, v.9, p. 1928-40, 2015.

SABATÉ, J.; VINAS, M.; SOLANAS, A.M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 19 – 25, 2004.

SARATALE, G.; KALME, S.; BHOSALE, S.; GOVINDWAR, S. Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 400-405, 2007.

SCHMIDT, S.K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 323–331, 1985.

SEO, J.; KEYN, Y; LI, Q.X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 278-309, 2009.

SERRANO, A.; TEJADA, M.; GALLEGO, M.; GONZALEZ, J.L. Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. **Science of The Total Environment**, v. 407, p. 4056–4061, 2009.

SHARIFI, M.; SADEGHI, Y.; AKBARPOUR, M. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, p. 463-470, 2007.

SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S.N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, Nottingham, v.87, n.12, p.2355-2373, 2008.

SIDDIQUI, S. & ADAMS, W.A. The fate of diesel hydrocarbons in soils and their effect on the germination of perennial ryegrass. **Environmental Technology**, v. 17, p. 49–62, 2002.

SILVA, G.S.; MARQUES, E.L.S.; DIAS, J.C.T; LOBO, A.P. GROSS, I.; 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.

SMITH, M.J.; FLOWERS, T.H.; DUNCAN, H.J.; ALDER, J. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 519-525, 2006.

SOUZA, E.F.; PERES, M.R.R.; MORAES, S.B. Avaliação do desempenho de surfactante para a solubilização de fases líquidas não aquosa em meio aquoso. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 532-538, 2010.

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.

TAMADA, I.S. **Biodegradação e avaliação fitotoxicológica do diesel e biodiesel**. 2013. 104 f. dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Rio Claro – Universidade Estadual: [s.n.].

TAMADA, I.S.; MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.M.; BIDOIA, E.D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1576-1581, 2012.

TAPANES, N.L.C.O.; ARANDA, D.D.G.; PEREZ, R.S.; CRUZ, Y.R. Biodiesel no Brasil: matérias-primas e tecnologias de produção. **Acta Scientiae et Technicae**, v.1, n.1, 2013.

TEJADA, M.; GONZALEZ, J.L.; HERNANDEZ, M.T.; GARCIA C. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties. **Bioresource Technology**, v. 99, 2872–2880, 2008.

THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1149-1153, 2007.

USEPA 712-C-96-167. (OPPTS 850.6200). Earthworm subchronic toxicity test. Ecological effects test guidelines. Washington DC, 1989.

VALENTINE, D.L.; MEZIC', I.; MAC'EŠIĆ', S.; CRNJARIĆ -ŽIĆ, N.; IVIĆ', S.; HOGAND, P.J.; FONOBEROVE, V.A. E LOIRE, S. Dynamic autoinoculation and the microbial ecology of a deep water hydrocarbon irruption. **PNAS**, v. 109, n. 50, p. 20286–20291, 2012.

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

VIEIRA, T.M.; SILVA, E.P.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; VIEIRA, J.D.G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**. Brasília/DF, 2006

WANG, X., VU, X., BADHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in Soil. **Environmental Science e Technology**, v. 24, p. 1086-1089, 1990.

WARD, O. et al. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.5, p.260-270. 2003.

WU, Y.; CHIANG, C.; LU, C. Respirometric evaluation by graphical analysis for microbial systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 92, n. 3, p. 137–152, 2004.

WYSZKOWSKA, J. & KUCHARSKI, J. Biochemical properties of soil contaminated by petrol. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 9, p. 479–485, 2000.

XU, Y.; LU, X. Bioremediation of crude oil-contaminated soil. Comparison of different bioestimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, v.183, p.395-401, 2010.

YASSINE, M.H.; WU, S.; SUIDAN, M.T.; VENOSA, A.D. Partitioning Behavior of Petrodiesel/Biodiesel Blends in Water. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 14, 2012.

YASSINI, M.H.; SHUYUN, W.U.; SUIDAN, M.T.; VENOSA, A.D. Aerobic biodegradation kinetics and mineralization of six Petrodiesel/Soybean-biodiesel blends. **Environmental Science Technology**, v. 47, p. 4619–4627, 2013.

YOSHIDA, N.; HOASHI, J.; MORITA, T.; MCNIVEN, S.J.; NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Improvement of a mediator-type biochemical oxygen demand sensor for on-site measurement. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 269-275, 2001.

YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y.S. e TAM, N.F.Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v. 31, p. 149-154, 2005.

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2008.

ZHANG, X.; PETERSON, C.L.; REECE, D.; HAWS, R.; MOLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the ASAE**, v. 41, p. 1423-1430, 1998.