

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo será disponibilizado somente a partir de 25/08/2018.



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

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE 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).

Mai - 2017

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE 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. Respirimetria. 4.
Biocombustível. 5. Microbiologia. 6. DGGE. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JAQUELINE MATOS CRUZ

ORIENTADOR: EDERIO DINO BIDOIA

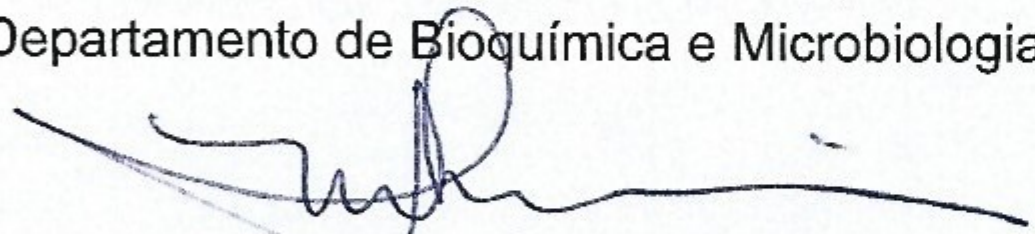
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



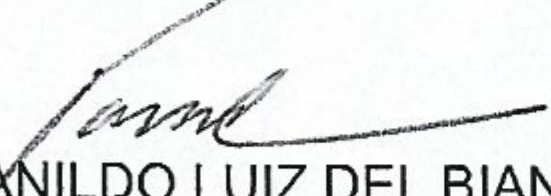
Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



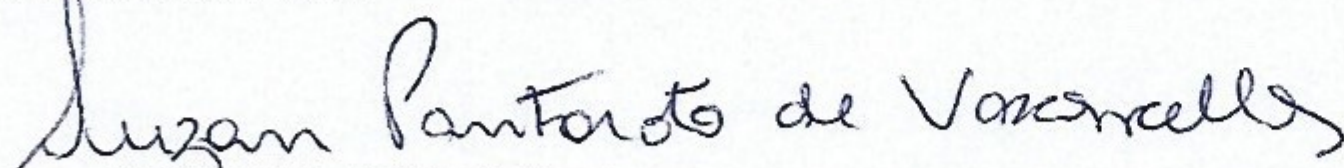
Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



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 pela 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

biossurfactante 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 CO ₂ 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 CO ₂ , H = válvula	57
Figura 3 - CO ₂ 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	65
Figura 4 - CO ₂ 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 - CO ₂ 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 <i>L. sativa</i> 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 <i>L. sativa</i> 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 - <i>Primers</i> 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 BIOSSURFACTANTE 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 BIODIAGRAMAÇÃO	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

CAPÍTULO 1

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, melaço, 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.

Referências

- ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAF, 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, ABOULWAF, 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*. 1ª 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 biossurfatante 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 BIOSSURFACTANTE 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).

Referências

- ADAMS, G. O.; FUFUYIN, 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 Alcool 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.

STROTSMANN, 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 BIOSSURFACTANTE 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 biossurfactantes 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).

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.; BRENDDEL, 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.

CAPÍTULO 4**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).

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.; BRENDDEL, 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.; GROTENHUIS, 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.