

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Fernando de Souza Vaz**

**Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de  
Armazenamento**

**Orientador:  
Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira**

**Goiânia – GO  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**Fernando de Souza Vaz**

**Bactérias Degradadoras de Biodiesel, Diesel e Misturas em Tanques de Armazenamento**

**Orientador:  
Profº. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira**

**Dissertação submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG  
como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre,  
área de concentração Microbiologia.**

**Goiânia – GO  
2010**

## **Agradecimentos**

A Deus, pela minha vida e por permitir mais esta conquista.

Aos meus pais, Valdemar e Waldeci, minha irmã Maria Cristina pelo amor e incentivo nos momentos de incertezas.

Ao professor Dr. José Daniel Gonçalves Vieira pelas oportunidades de aprendizado, pela confiança, pelos seus conselhos e amizade.

Aos professores Dr. Geraldo Sadoyama, Dra. Maria Cláudia Dantas pelos esclarecimentos nos momentos de dúvida.

Ao professor Dr. André Kipnis pela ajuda no sequenciamento das amostras.

Ao meu amigo Victor Rodrigues pela ajuda dada antes da minha prova de seleção de mestrado.

Aos amigos Thais Maitan, Natalia Carvalhaes, Ariana Alves, Camila Carvalho e Tiago Rodrigues pela amizade, pela ajuda e pelos momentos que jamais serão esquecidos.

A Lêda Maria pelo apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários José Clementino e Kariny Soares pelo constante auxílio e apoio de ordem administrativa.

A Capes pela bolsa de mestrado concedida e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do IPTSP/UFG pela oportunidade de realização deste trabalho.

A FINEP pelo auxílio financeiro (Convenio nº: 01.06.1021.00 – Projeto Rede ARMAZEBIOL).

A Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel na pessoa do Dr Eduardo Cavalcante Coordenador da sub-área de armazenamento.

A oficina TecDiesel por ter disponibilizado amostras de combustíveis dos veículos com defeito.

A ALE distribuidora de combustíveis pela cessão do diesel puro.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho tivesse êxito e fosse realizado.

O meu Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Diesel.....	1
1.2. Tentativas de Substituição do Óleo Diesel.....	2
1.3. Biodiesel.....	3
1.3.1. Produção do Biodiesel.....	4
1.3.2. Biodiesel no Brasil.....	6
1.3.3. Mistura Biodiesel/Diesel.....	7
1.4. Contaminação Ambiental dos Grandes Centros Urbanos por Combustíveis.....	8
1.5. Degradação Microbiana do Biodiesel.....	9
1.6. Análise da Diversidade Microbiana.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta de Amostras.....	13
3.2. Filtragem de Amostras e Isolamento Bacteriano.....	14
3.3. Determinação em Placa da Capacidade de Biodegradação de Biodiesel B100, Mistura (B5) e Diesel Puro .....	14
3.4. Extração de DNA.....	15
3.5. Amplificação para a Região Codificante de 16S rDNA por <i>Polimerase Chain Reaction</i> .(PCR).....	16
3.6. Purificação dos produtos da <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR).....	16
3.7. Sequenciamento dos Produtos da Amplificação.....	17
4. RESULTADOS.....	18

4.1. Isolamento de Bactérias da Mistura Biodiesel/Diesel (B3) e Biodiesel B100 em Tanques de Armazenamento.....	18
4.2. Caracterização das Bactérias Pertencentes à Bacterioteca do LAMAB/IPTSP/UFG.....	19
4.3. Determinação em Placa da Capacidade de Biodegradação de Biodiesel B100 Mistura (B5) e Diesel Puro .....	20
4.4. Análise do Sequenciamento.....	28
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
8. ANEXOS.....	44

## **Lista de Figuras**

Figura 1	Cadeia produtiva biodiesel. ....	6
Figura 2	Produção Brasileira de Biodiesel por Unidade da Federação, 2007 e 2008.....	7
Figura 3	Principais Matérias-Primas Utilizadas na Produção de Biodiesel.....	7
Figura 4	Representação do início dos testes de biodegradação.....	21
Figura 5	Representação do fim dos testes de biodegradação.....	21

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Relação das bactérias isoladas do tanque de combustível do posto da UFG campus Goiânia.....	18
Tabela 2	Relação das bactérias isoladas do tanque de combustível de veículos com defeito na bomba de combustível.....	19
Tabela 3	Relação de bactérias pertencentes à bacterioteca LAMAB/IPTSP/UFG.....	20
Tabela 4	Resultado do teste de biodegradação para B100 e diesel puro após 48 horas.....	22
Tabela 5	Resultado do teste de biodegradação para B5 após 48 horas .....	23
Tabela 6	Resultado do teste de biodegradação para B100 e diesel puro após 7 dias.....	24
Tabela 7	Resultado do teste de biodegradação para B5 após 7 dias.....	25
Tabela 8	Resultado do teste de biodegradação para B100 e diesel puro após 14 dias.....	26
Tabela 9	Resultado do teste de biodegradação para B5 após 14 dias.....	27
Tabela 10	Identificação dos isolados por comparação das sequências no banco de dados <i>GenBank</i> .....	29

## Lista de Abreviaturas

ANP	Agência Nacional do Petróleo
B3	Biodiesel 3%
B5	Biodiesel 5%
B100	Biodiesel 100%
BBL	Bactéria da Bacterioteca do LAMAB
BHI	<i>Brain and Heart Infusion</i>
BTP	Bactéria Isolada de Tanque de Combustível
BTV	Bactéria Isolada de Tanque de Veículo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DCPIP	2,6 diclorofeno-indofenol
DQO	Demanda química de oxigênio
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LAMAB	Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia
LAMES	Laboratório de Análise e Métodos de Extração
m <sup>3</sup> /ano	Metro cúbico por ano
mL	Mililitro
NO <sub>x</sub>	Óxido Nitroso
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PETROBRAS	Petróleo Brasileiro S/A
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rpm	Rotações por minuto
t/ano	Tonelada por ano
UFG	Universidade Federal de Goiás
µg	Micrograma
µM	Micrômetro
µL	Microlitro
v/v	Volume por volume
°C	Grau Celsius

## RESUMO

Os combustíveis derivados de petróleo tem sido os responsáveis pela maior porção do total de poluição das águas, dos solos e do ar de todo o mundo. Baseado neste fato, algumas propostas têm sido feitas para a substituição do diesel derivado de petróleo. Uma alternativa é o biodiesel, combustível feito de ésteres, metilados ou etilados, de óleos naturais provenientes de oleaginosas (soja, milho, mamona, palma, girassol, gorduras animais etc). O biodiesel é mais suscetível que o diesel ao ataque de bactérias, que ocorrem naturalmente no ambiente, devido à sua composição química ser muito mais simples que a do óleo diesel. O objetivo desta pesquisa foi o isolamento, a identificação e a caracterização de bactérias capazes de degradar diesel, biodiesel e mistura (B5). Os isolados bacterianos foram obtidos partir de amostras de combustível coletadas de tanques de armazenamento: (1) do posto de combustível do setor de transportes da Universidade Federal de Goiás campus Goiânia; (2) de veículos que estavam em uma oficina com diagnóstico de entupimento da bomba de combustível, e (3) de tanques de biodiesel puro (B100) obtidos direto da produção. As amostras de combustível foram filtradas em membrana filtrante com poros de 0,45µM. Estas membranas foram incubadas a 30°C por 7 dias em Ágar BHI e Ágar Nutriente até a obtenção de colônias puras. A verificação da capacidade de biodegradação foi realizada em micro placas de 96 orifícios tipo ELISA. Os isolados foram inoculados em uma solução contendo meio de cultura Mínimo, solução corante oxi-redutor DCPIP (2,6 diclorofenol-indofenol) e combustível (biodiesel puro, mistura biodiesel/diesel e diesel puro) como fonte de carbono. Todos os 41 isolados testados apresentaram potencial de degradação para os combustíveis analisados. Vinte e nove isolados foram identificados pelo sequenciamento da região 16S rDNA, e identificados como *Bacillus valismortis* (2), *B. licheniformis* (3), *B. thuringiensis* (1), *B. amyloliquefaciens* (2), *B. subtilis* (2), *Lysinibacillus sphaericus* (11), *L. fusiformis* (2), *Staphylococcus sp.* (2), *S. capitis* (1), *Kocuria palustris* (1), *Citrobacter amalonaticus* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (1). Foi confirmado o potencial de degradação do biodiesel B100, mistura de biodiesel/diesel (B5) e diesel puro por parte das bactérias isoladas através do teste de oxi-redução utilizando o corante DCPIP.

**Palavra chave:** biodiesel (B100); biodiesel (B5); diesel; biodegradação.

## ABSTRACT

Fuels derived from oil has been responsible for the largest portion of total water pollution, soil and air around the world. Based on this fact, some proposals have been made for the replacement of diesel obtained from petroleum. An alternative is biodiesel, fuel made from esters, methyl or ethyl, natural oils from oilseeds (soybeans, corn, rapeseed, palm, sunflower, animal fats etc). Biodiesel is more susceptible than diesel to attack by bacteria that occur naturally in the environment due to its chemical composition is much simpler than that of diesel oil. The objective of this research was the isolation, identification and characterization of bacteria capable of degrading diesel, and biodiesel blends (B5). The bacterial isolates were obtained from samples collected from fuel storage tanks: (1) gas station in the transportation sector, Federal University of Goiás Goiania campus, (2) vehicles that were in a workshop with a diagnosis of obstruction of fuel pump, and (3) tank of pure biodiesel (B100) obtained directly from production. The fuel samples were filtered through a membrane filter with pores of 0.45  $\mu\text{M}$ . These membranes were incubated at 30 °C for 7 days in BHI Agar and Nutrient Agar to obtain pure colonies. The verification of the biodegradation was performed in micro plates 96 holes ELISA. The isolates were inoculated in a solution containing the culture Low, oxy-dye reducer DCPIP (2,6-dichlorophenol indophenol) and fuel (pure biodiesel blend biodiesel / diesel fuel and pure diesel) as carbon source. All 41 isolates tested showed degradation potential for fuel analysis. Twenty-nine isolates were identified by sequencing of 16S rDNA, and identified as *Bacillus valismortis* (2), *B. licheniformis* (3), *B. thuringiensis* (1), *B. amyloliquefaciens* (2), *B. subtilis* (2), *Lysinibacillus sphaericus* (11), *L. fusiformis* (2), *Staphylococcus sp.* (2), *S. capitis* (1), *Kocuria palustris* (1), *Citrobacter amalonaticus* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (1). It was confirmed the potential degradation of B100 biodiesel, a blend of biodiesel / diesel (B5) and pure diesel by bacteria isolated by testing using the redox dye DCPIP.

Keyword: biodiesel (B100) biodiesel (B5); diesel; biodegradation.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Diesel

O óleo diesel é um combustível fóssil, derivado do petróleo, muito utilizado para movimentar máquinas de grande porte. Formado basicamente por hidrocarbonetos (compostos químicos constituídos por átomos de hidrogênio e carbono), também possui em sua composição uma pequena quantidade de oxigênio, nitrogênio e enxofre. O diesel é um líquido amarelado e viscoso, límpido, pouco volátil, de cheiro forte e marcante e com nível de toxicidade mediano (DEMEC 2009).

Esse combustível foi utilizado por Dr. Rudolph Diesel, quando o mesmo trabalhava no desenvolvimento de motores, por volta do ano de 1859. Pelo fato da mistura do diesel com o ar produzir uma forte explosão quando comprimida, tal reação passou a ser utilizada para gerar energia e movimentar máquinas e motores de grande porte. Esses motores são conhecidos como motores de ciclo diesel e possuem as mais diversas aplicações, tais como movimentar: ônibus, caminhões, embarcações marítimas, máquinas de grande porte, locomotivas e aplicações estacionárias (geradores elétricos, por exemplo).

Sendo largamente utilizado devido à sua disponibilidade, rendimento e baixo custo, os derivados de petróleo, como o diesel, tiveram sua procura aumentada ao longo dos anos (Isigigür et al 1993).

Devido grande demanda por combustíveis derivados do petróleo, os acidentes envolvendo a contaminação do meio ambiente por esses combustíveis passaram a se tornar mais frequentes. Esses acidentes são geralmente de grande impacto ambiental, uma vez que o petróleo é composto por subprodutos altamente poluentes (Isigigür et al 1993).

A atividade petrolífera, dentre as atividades industriais, é uma das que mais ameaçam o meio ambiente. Em toda a sua cadeia produtiva há a possibilidade de contaminação do ar, das águas e dos solos por uma gama de compostos altamente poluentes. Frequentes ocorrências de derramamentos em solos brasileiros vêm motivando a realização de pesquisas na área de biorremediação de solos (Soriano 2000).

De acordo com Rudell (1994), hoje em dia, a parte volátil do diesel é um poluente comum do ar e a exposição a estes compostos voláteis são reportadas por causarem desconforto e afetar as funções pulmonares. A combustão do diesel também

causa a liberação de um grande número de hidrocarbonetos aromáticos, tais como os aromáticos policíclicos, que são considerados carcinogênicos (Quarels & Lewis 1990).

Em um mundo em que a consciência ambiental vem crescendo, soluções para a preservação e conservação de nossos recursos naturais aliada à preocupação referente aos custos e a disponibilidade, colocam os produtos derivados do petróleo como alvo especial desta discussão. Acredita-se que em face de tantas ameaças, tais como a poluição, disponibilidade e custos, muitas mudanças na matriz energética devem ocorrer rapidamente (Follis 1994).

## **1.2. Tentativas de Substituição do Óleo Diesel**

Muitas pesquisas têm sido feitas para descobrir novas fontes de energia que sejam tão eficientes quanto o diesel, sem serem tão prejudiciais à natureza e que sejam economicamente viáveis (Follis 1994).

Metano, etanol, gás natural e eletricidade têm sido apresentados como alternativas promissoras, mas cada uma requer muitas mudanças em infra-estrutura de construção, manutenção e maquinaria dos motores, o que as torna economicamente inviáveis (Newman 1993).

Historicamente, o uso direto de óleos vegetais como combustível surgiu junto com o primeiro motor a diesel, mas foram rapidamente superados pelo uso deste derivado de petróleo, por fatores tanto econômicos quanto técnicos. Àquela época, os aspectos ambientais, que hoje privilegiam os combustíveis renováveis, como o óleo vegetal, não foram considerados importantes (Biodiesel Brasil 2009).

A chamada "crise do petróleo" em 1972 foi a mola propulsora para o início das pesquisas brasileiras em busca de um combustível alternativo. O *lobby* canavieiro garantiu o Pro-álcool, mas o desenvolvimento de outros combustíveis alternativos não teve a mesma sorte, apesar dos fatores agrícolas, climáticos, econômicos e logísticos serem positivos. O Brasil passou a produzir álcool em grande escala em 1979 e ao final da década de 1980 quase 80% da frota de veículos produzida no país, utilizavam motores movidos a álcool (Biodiesel Brasil 2009).

No Brasil, por várias razões, incluindo-se a redução dos preços do barril de petróleo e o desinteresse da empresa Petróleo Brasileiro S/A (PETROBRAS), as atividades de produção experimental do combustível derivado de óleo vegetal, foram paralisadas, enquanto que a Comunidade Econômica Européia investia, com sucesso, na

pesquisa de combustíveis vegetais, entre eles o de óleo de canola (colza), a matéria prima mais utilizada. Na Malásia e nos Estados Unidos foram realizados experimentos bem sucedidos com palma e soja, respectivamente (Biodiesel Brasil 2009).

### **1.3. Biodiesel**

Pela definição da legislação brasileira (Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005), biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável, usado em motores de combustão interna com ignição por compressão ou ainda, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis de origem fóssil (Biodiesel 2009).

Em termos gerais, o biodiesel é um combustível alternativo de queima limpa, produzido de óleos vegetais (girassol, mamona, soja, babaçu e demais oleaginosas) ou de gorduras animais e é tido como um combustível renovável. O biodiesel não contém petróleo, mas pode ser adicionado a este, formando uma mistura, que pode ser usada em motores de ignição a compressão com uma mínima necessidade de modificação (Biodiesel 2009).

Uma vantagem do biodiesel é que sua combustão tem demonstrado ser mais limpa que a combustão de diesel derivado de petróleo, pois suas propriedades permitem a redução na emissão de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), particulados, óxido nitroso ( $\text{NO}_x$ ), eliminação de enxofre e da emissão de compostos aromáticos. Sendo proveniente de uma energia limpa, não poluente, o seu uso em motor a diesel convencional resulta, quando comparado com a queima do diesel de petróleo, numa redução substancial de monóxido de carbono e de hidrocarbonetos não queimados (Newman 1993).

O biodiesel pode ser utilizado diretamente em motores e equipamentos movidos a diesel, reduzindo os custos com modificações em infra-estrutura (Newman 1993). Vale lembrar que durante a Exposição Mundial de Paris, em 1900, um motor de ciclo diesel foi apresentado ao público, funcionando com óleo de amendoim. Os primeiros motores a diesel eram de injeção indireta. Esses motores eram alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais e até mesmo por óleos de peixe (Biodiesel Brasil 2009).

Questões sobre a viabilidade de se produzir quantidades suficientes de Biodiesel para suprir a demanda de combustíveis têm sido levantadas. Para isto, pesquisadores estão trabalhando para cortar custos, melhorar a eficiência e utilizar fontes mais baratas para produção do mesmo. Algumas respostas têm sido obtidas por algumas técnicas

como empregar associações (misturas) de biodiesel/diesel em várias proporções, o que também resulta em menores emissões de poluentes e, em alguns casos, menos situações ambientalmente perigosas (Chowdhury & Fouhy, 1993).

### **1.3.1. Produção do Biodiesel**

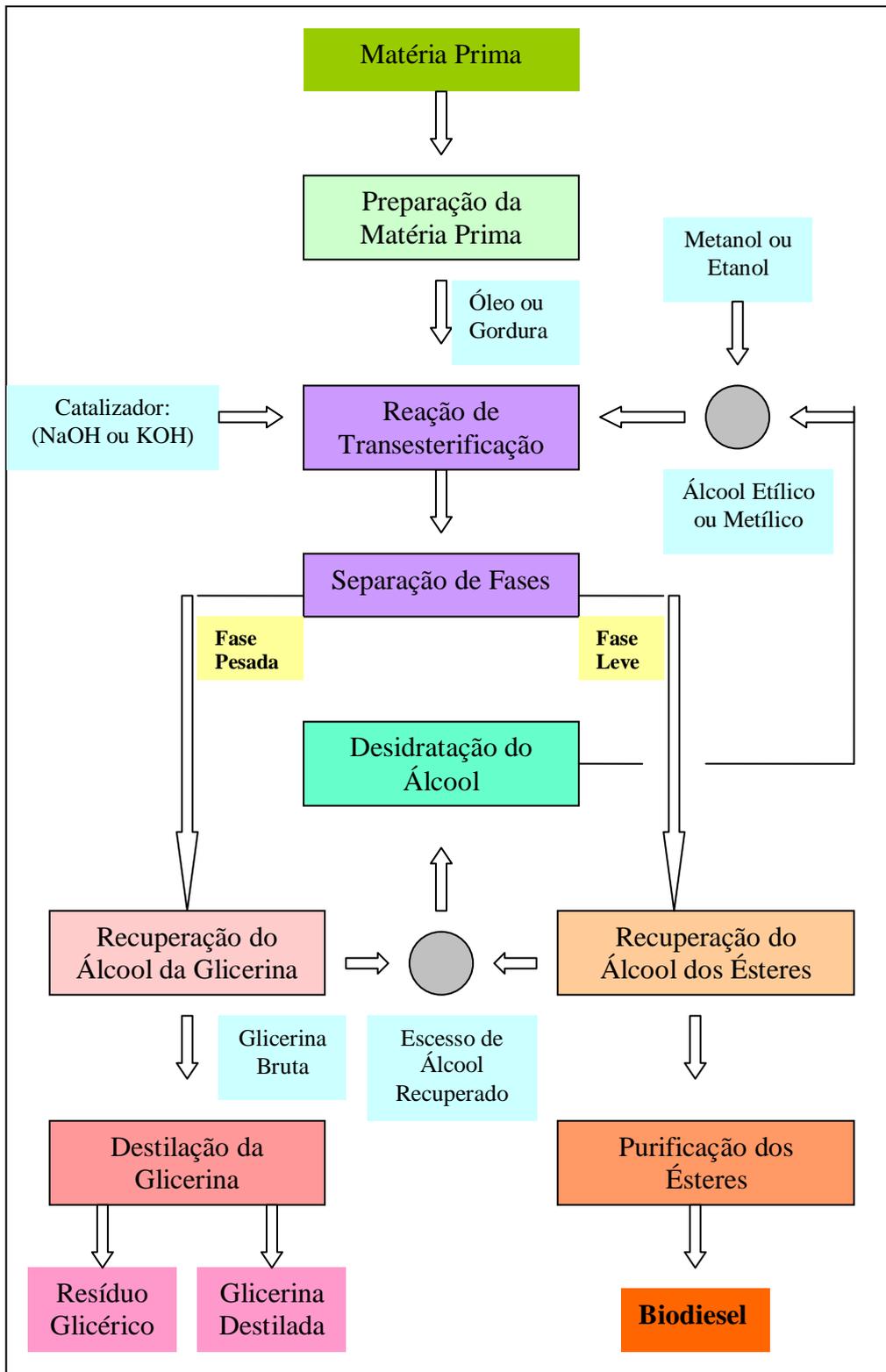
O biodiesel é comumente produzido por meio de uma reação química denominada transesterificação, mas pode também ser utilizado o craqueamento, semelhante à produção de diesel derivado de petróleo (Biodiesel Brasil 2009).

Os triacilgliceróis, presentes nos óleos vegetais, reagem com o metanol, na presença de um catalisador (ácido ou base), produzindo glicerol (co-produto) e o éster metílico de ácido graxo, o biodiesel (conhecido pelo acrônimo em inglês *FAME* - *fatty acid methyl ester*) (Figura 1) (Biodiesel Brasil 2009).

A transesterificação promove a separação da glicerina do óleo vegetal. Cerca de 20% de uma molécula de óleo vegetal é formada por glicerina, o que o torna mais denso e viscoso (Biodiesel Brasil 2009).

Estes ésteres ou ácidos graxos metil esterificados são compostos de baixa complexidade estrutural, formados predominantemente de oito diferentes tipos de ácidos graxos metil esterificados com cadeias de 16 a 18 átomos de carbono, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato. Esse combustível pode ser misturado a qualquer outro combustível derivado do petróleo (Newman 1993).

## Fluxograma do Processo de Produção de Biodiesel



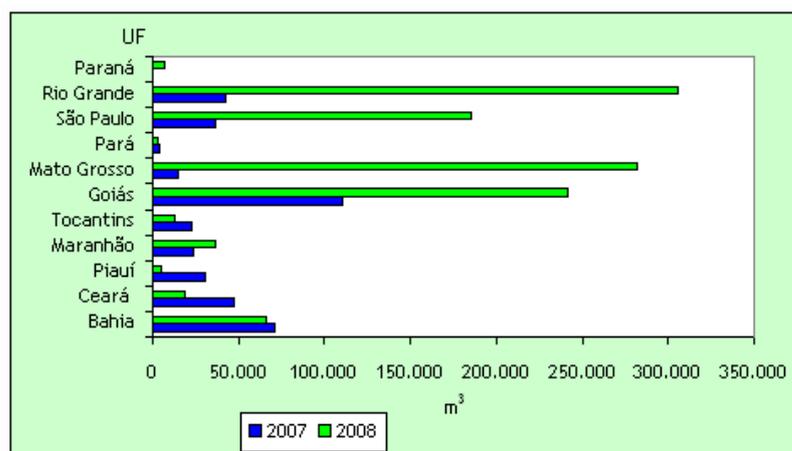
**Figura 1** Cadeia produtiva biodiesel. (Fonte: Tecbio). Acesso em 08 de setembro de 2009.

### 1.3.2. Biodiesel no Brasil

O Brasil tem em sua geografia grandes vantagens climáticas por se situar em uma região tropical, com altas taxas de luminosidade e de temperaturas médias anuais de 15°C a 21°C (Climatempo 2009). Além disso, possui disponibilidade hídrica e regularidade de chuvas, o que torna o país com o maior potencial mundial para produção de energia renovável (Biodiesel 2009).

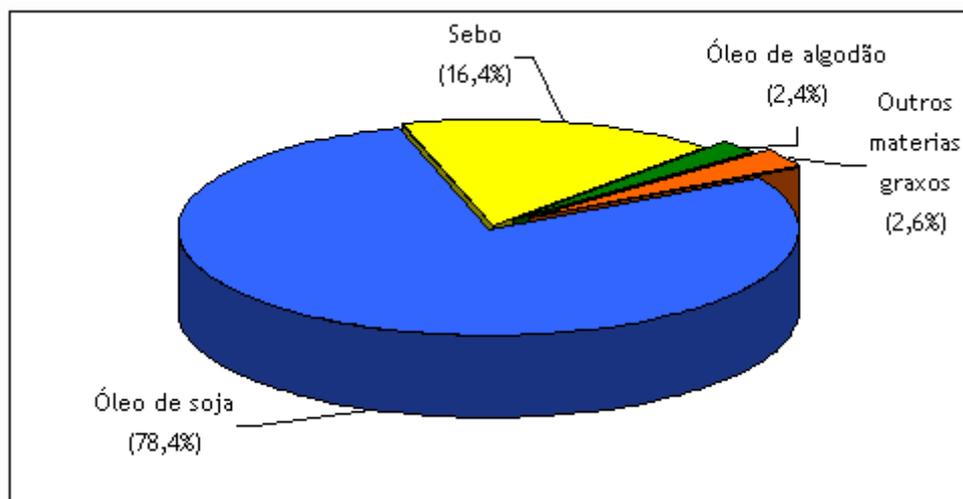
Com uma área cultivável menor que um terço do seu território, o Brasil constitui a maior fronteira para expansão agrícola do mundo. O potencial é de cerca de 150 milhões de hectares, sendo 90 milhões referentes às novas fronteiras, e outros 60 referentes a terras de pastagens que podem ser convertidas em exploração agrícola em curto prazo. Segundo o governo brasileiro, o Programa Biodiesel visa à utilização apenas de terras inadequadas para o plantio de gêneros alimentícios. Outro fator para a produção do biodiesel é a grande diversidade de opções para sua produção, a palma e o babaçu, no norte; a soja, o girassol e o amendoim, nas regiões sul, sudeste e centro-oeste; e a mamona, que além de ser a melhor opção do semi-árido nordestino, apresentam-se também como alternativas às demais regiões do país (Biodiesel 2009).

A produção brasileira de biodiesel em 2008 foi de 1.164.332 m<sup>3</sup>/ano e os principais estados produtores foram: Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Goiás (Figura 2) (IEA-SP 2009).



**Figura 2** Produção Brasileira de Biodiesel por Unidade da Federação, 2007 e 2008 (Fonte: ANP). Acesso 02 de dezembro de 2009.

De acordo com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o Brasil não deve privilegiar rotas tecnológicas, matérias-primas e escalas de produção agrícola e agroindustrial. No entanto, a soja ainda é a oleaginosa preponderante (Figura 3). De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP), em dezembro de 2008, as principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel foram: óleo de soja, óleo de sebo, óleo de algodão e em menores proporções outros materiais graxos (IEA-SP 2009).



**Figura 3** Principais Matérias-Primas Utilizadas na Produção de Biodiesel, Dezembro de 2008. (Fonte: ANP Boletim mensal de biodiesel 2009). Acesso 02 de dezembro de 2009.

Na safra 2007/2008, Goiás ocupou o quarto lugar na produção de grãos com destaque para soja e algodão, e o terceiro lugar na produção nacional de biodiesel. No entanto, o estado de Goiás conta com instalações para processar 5,7 milhões de t/ano de oleaginosas, colocando-se em quarto lugar na capacidade instalada em produzir óleos vegetais (IEA-SP 2009).

### 1.3.3. Mistura Biodiesel/Diesel

O biodiesel pode ser usado misturado ao óleo diesel proveniente do petróleo em qualquer proporção. Dependendo desta proporção, há a necessidade de mínimas alterações mecânicas nos atuais motores a diesel (ANFAVEA 2009).

A concentração de biodiesel é informada por meio de uma nomenclatura específica, definida por "BX", onde B refere-se à nomenclatura Biodiesel e X refere-se à percentagem em volume do biodiesel ao qual é misturado ao diesel do petróleo.

Assim, B5, B20 e B100 referem-se, respectivamente, às misturas de biodiesel ao diesel contendo 5, 20 e 100% de biodiesel (Biodiesel 2009).

#### **1.4. Contaminação Ambiental dos Grandes Centros Urbanos por Combustíveis**

Os produtos derivados do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel, representam uma importante fonte de contaminação do meio ambiente nos centros urbanos. Em todo mundo, em particular nas grandes metrópoles, tem crescido a preocupação ambiental com as atividades de revenda e de abastecimento de combustíveis líquidos, uma vez que tais atividades apresentam um alto potencial poluidor do solo e da água subterrânea, particularmente naquelas regiões onde os deslocamentos são fortemente estruturados no transporte individual por veículos de passeio, em detrimento de outras formas de transporte coletivo e de massa (Oliveira, 1992).

Além da queima dos combustíveis fósseis estarem historicamente associadas à poluição atmosférica, as instalações relativas aos sistemas de armazenagem subterrâneos de combustíveis para os derivados de petróleo, configuram-se como empreendimentos capazes de gerar passivos acidentes ambientais urbanos, em função de possíveis vazamentos nos tanques de armazenamento ou tubulações, assim como derramamentos produzidos por acidentes no transporte e manuseio destes produtos, criando assim uma grande preocupação não só com os riscos de incêndios e explosões, mas também com a contaminação ambiental do solo e da água subterrânea (Blackman, 1996).

Os tanques e instalações subterrâneas de armazenamento de combustíveis têm vida útil em média, de 25 anos, uma vez que de acordo com estatísticas internacionais, os tanques com mais de 20 anos de instalação estão mais suscetíveis a apresentar problemas de vazamentos devido à corrosão. Por se tratarem de instalações subterrâneas onde a observação direta dos equipamentos é impossível, historicamente sempre houve grande dificuldade na detecção de vazamentos em estágios iniciais (Cole 1994).

Conforme as leis brasileiras, a contaminação ambiental é considerada crime ambiental pela Lei Federal 9.605/98, regulamentada pelo Decreto 3.179/99 (IBAMA 2009). A legislação brasileira obriga todos os postos de revenda de combustíveis a serem devidamente licenciados pelos órgãos ambientais competentes após cadastramento do mesmo. A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Nº 273 de 2000, dispõe que na ocorrência de passivos acidentes

ambientais, os proprietários, arrendatários ou responsáveis pelo estabelecimento, equipamentos e sistemas além dos fornecedores de combustíveis, responderão solidariamente pela situação, contribuindo para o saneamento das áreas impactadas (MMA 2009).

O crescente número de acidentes tem sido motivo de preocupação pelas autoridades competentes e de repercussão na sociedade, pois essas contaminações com substâncias tóxicas podem atingir as águas subterrâneas, que estão sendo ou serão usadas como fonte de abastecimento para consumo humano (FURIGO et al 2006).

O problema, tratado na sua escala devida, é tipicamente multidisciplinar e exige o domínio dos processos químicos e biológicos que estão inerentemente associados. Segundo Furigo et al (2006), vários métodos podem ser empregados para remover hidrocarbonetos do solo e água subterrânea tais como extração de vapor do solo, bombeamento e biorremediação. Ainda conforme os mesmos autores, o benefício da biorremediação é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa, bem como, pelo seu custo ser muito mais baixo.

Dentre as novas estratégias para conter o impacto ambiental causado por acidentes e derrames de combustíveis, a biorremediação desponta como a menos agressiva e mais adequada para a manutenção do equilíbrio ecológico (Leahy & Colwell 1990).

### **1.5. Degradação Microbiana do Biodiesel**

O biodiesel é mais suscetível do que o diesel ao ataque de bactérias, que ocorrem naturalmente no ambiente, devido à sua composição química (alto número de octanas) ser muito mais simples que a do óleo diesel (Liu & Sulfito 1994). Comparando-se os ácidos graxos presentes no biodiesel com os alcanos e compostos aromáticos de alto peso molecular que compõem o diesel, a ação de degradação por parte das bactérias demonstrou ser mais eficiente no biodiesel (Follis 1994).

A provável rota para a degradação do biodiesel consiste: 1) clivagem do metil éster por uma esterase, produzindo ácido graxo e o álcool associado e 2) quebra do ácido graxo pelo Ciclo de Krebs, metabolismo respiratório ou incorporação direta nos lipídeos celulares. Certas bactérias tais como *Pseudomonas oleovorans*, *P. mendocina*, *P. aeruginosa*, *Marinomonas vaga*, *Escherichia coli*, *Burkholderia gladioli*, *B. cepacia*,

*Bacillus subtilis*, entre outras apresentam potencial para a degradação de biodiesel (Follis 1994).

A contaminação de um ambiente com hidrocarbonetos por um lado acarreta, geralmente, o enriquecimento primário dos microrganismos capazes de utilizá-los como fontes nutritivas e, por consequência, os microrganismos que utilizam os metabólitos produzidos por estes primeiros também serão enriquecidos. Por outro lado, o impacto das alterações ambientais nas comunidades microbianas, torna-se um meio seletivo e redutor da diversidade biológica (Leahy & Colwell 1990).

As condições ambientais são de fundamental importância na atuação das bactérias, fungos ou algas no processo de biodegradação de hidrocarbonetos. Outros fatores que corroboram para o aumento na capacidade de biodegradação dos microrganismos são: indução e/ou desrepressão de enzimas específicas; enriquecimento seletivo de organismos biodegradadores destes compostos, aquisição de plasmídeos e mudanças genéticas nas atividades metabólicas (Rosato 1997).

Os plasmídeos têm um papel importante na adaptação, pois são transferidos de forma natural via transformação e conjugação para outras linhagens receptoras, conferindo a estas uma nova característica. A transferência dos plasmídeos metabólicos para linhagens com capacidade limitada de utilização de alguns compostos pode expandir o potencial catabólico das mesmas, sendo estas induzidas à seleção quando expostas a hidrocarbonetos (Rosato 1997).

## **1.6. Análise da Diversidade Microbiana**

Diversidade biológica é a variedade de espécies encontradas em um ecossistema, assim como a variedade de genótipos dentro da mesma espécie (TÓTOLA & CHAER 2002). Segundo Lambais et al (2005), a diversidade da microbiota pode ter uma importância relevante na manutenção da qualidade dos solos.

Durante muito tempo foi bastante limitada a capacidade de se realizar estudos sobre a diversidade e identificação de procaríotos dos solos, já que uma pequena porcentagem (0,1% a 0,5%) podia ser acessada pelos métodos convencionais, com base em cultivo (Torsvik et al 2002).

O monitoramento do processo de biodegradação, considerando as comunidades que atuam sequencial e sinergicamente, pode ser analisado usando sondas de DNA específicas para diferentes genes que regulam as vias catabólicas dos hidrocarbonetos.

Sondas de DNA, provenientes dos genes TOL (oxidação do tolueno) e NAH (oxidação do naftaleno), foram utilizadas por Follis (1994) na hibridização de colônias com amostras provenientes de solos contaminados.

Entretanto, as técnicas de hibridização oferecem algumas dificuldades para a análise de grande amostragem coletada em campo. Atualmente, o uso da reação de PCR melhora a sensibilidade além da facilidade de uso em amostras coletadas de sedimentos (Rosato 1997).

A análise da estrutura de comunidades de procariotos utilizando as informações da sequência do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (16S rDNA) tem se tornado cada vez mais utilizada, devido ao fato deste gene possuir características fundamentais que possibilitam a identificação das espécies, tais como: presença de regiões com sequência de nucleotídeos hipervariáveis entre regiões conservadas; aparente ausência de transferência genética lateral; presença em todos os procariotos e um tamanho médio de 1.500 nucleotídeos, satisfatório para os estudos filogenéticos (Armann & Ludwig 2000).

O sequenciamento do 16S rDNA tem sido muito utilizado para a identificação e caracterização das comunidades de procariotos (Chelius & Triplett 2001; Derakshani et al 2001; Lambais et al 2005). Os resultados destas análises são comparados com as sequências existentes em bancos de dados públicos como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

O isolamento, a identificação e a caracterização de microrganismos capazes de degradar biodiesel, é o primeiro passo no desenvolvimento dos processos de biorremediação. Assim, o desenvolvimento de testes rápidos com processos simples de triagem que detectam mudanças químicas no biodiesel podem indicar a presença de microrganismos degradadores (Rosato 1997).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Isolar bactérias em tanques de armazenamento de combustível e determinar a capacidade de degradação de biodiesel B100, mistura B5 e diesel puro.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Isolar bactérias contidas na mistura diesel/biodiesel (B3) e biodiesel (B100) a partir de amostras coletadas dos tanques:
  - ✓ de posto de combustível do setor de transportes da UFG;
  - ✓ de armazenamento de veículos automotores que utilizam este combustível e que se encontravam em oficina mecânica, com diagnóstico de entupimento da bomba de combustível;
  - ✓ de biodiesel B100 obtido diretamente das fábricas.
- Avaliar por metodologia rápida a atividade de degradação “*in vitro*” do biodiesel B100, mistura (B5) e diesel puro pelos isolados bacterianos obtidos anteriormente, bem como das cepas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (IPTSP/UFG);
- Identificar por sequenciamento da região 16S rDNA as cepas que degradam biodiesel B100, mistura (B5) e diesel puro.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Foram utilizados 41 isolados bacterianos sendo 16 pertencentes à bacterioteca do LAMAB e os outros 25 obtidos de amostras da mistura diesel/biodiesel B3 coletados de tanques de armazenamento: de posto de combustível, de veículos automotores e de biodiesel B100 direto da produção.

Todas as bactérias estão preservadas em caldo Brain and Heart Infusion (BHI) acrescido de glicerol 20 % (v/v) mantidos a temperatura de -20°C (Peixoto & Vieira 2006).

Durante o desenvolvimento do presente trabalho houve uma mudança na legislação brasileira que regula o uso do biodiesel, passando o mesmo ser acrescido em uma percentagem de 5% sobre o diesel. Neste trabalho o isolamento dos microrganismos procedeu-se em amostras da mistura B3 e os testes foram realizados em mistura B5 seguindo orientações da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, setor responsável pelo gerenciamento das pesquisas nesta área.

#### **3.1. Coleta de Amostras**

1. Foram coletados cinco litros da mistura do combustível diesel/biodiesel (B3) do posto de combustível pertencente ao setor de transportes da UFG.
2. Foram coletadas amostras de combustível do tanque de diversos veículos movidos a diesel/biodiesel que se encontravam na oficina Tec Diesel Serviços e Auto Peças. Estes veículos haviam dado entrada na oficina com diagnóstico confirmado de entupimento da bomba de combustível. Devido à quantidade de combustível disponível em cada veículo, não foi determinado um padrão de volume para a coletada.
3. Foram coletados dois litros de biodiesel B100 obtidos pela técnica de metil esterificação de óleos palma, mamona, soja, sebo bovino e sebo bovino com soja produzidos pela Brasil Eco Diesel e Granol Óleos Vegetais e cedidas pelo Laboratório de Análise e Métodos de Extração (LAMES/UFG).

### **3.2. Filtragem de Amostras e Isolamento Bacteriano**

As amostras foram filtradas em membrana filtrante, 0,45 $\mu$ M (Millipore), previamente esterilizada, utilizando-se bomba de vácuo. Para os tópicos 1 e 3, a cada 500 mL de combustível filtrado, a membrana era substituída e colocada diretamente sobre ágar BHI e Nutriente. Para o tópico 2 o combustível proveniente de cada veículo era separado em dois volumes iguais e depois filtrado conforme técnica descrita anteriormente. As membranas provenientes dos veículos eram então colocadas sobre ágar BHI e Nutriente. Todas as placas foram incubadas por até sete dias a 30°C (Peixoto & Vieira 2006).

À medida que as colônias cresciam, eram retiradas e inoculadas em novas placas contendo ágar BHI e Nutriente, de acordo com a origem da membrana. Após o crescimento, as colônias foram selecionadas e transferidas para novas placas com ágar BHI e Nutriente de acordo com sua morfologia e incubadas por até 72 horas até obtenção de colônias puras (Peixoto & Vieira 2006).

### **3.3. Determinação em Placa da Capacidade de Biodegradação de Biodiesel B100, Mistura (B5) e Diesel Puro**

As bactérias isoladas e as pertencentes à bacterioteca do LAMAB foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 30°C até o crescimento atingir um padrão de absorvância 0,5, medida em espectrofotômetro (aproximadamente  $9 \times 10^8$  células) (Vieira et al 2007).

As culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 e centrifugado novamente. Este processo foi repetido por mais uma vez. Após o processo de lavagem, os isolados foram mantidos em solução tampão fosfato por 24 horas a 30°C, para que possíveis nutrientes armazenados no seu citoplasma fossem utilizados para sua sobrevivência.

Após a incubação, os isolados foram novamente inoculados em uma solução de tampão fosfato pH 7,2 padronizando-se para uma absorvância de 0,5.

Em seguida os testes foram realizados em placas de acrílico (tipo ELISA) com 96 poços previamente esterilizados adicionando-se 20  $\mu$ L da solução de bactérias a 170  $\mu$ L de meio de cultura mínimo, 6  $\mu$ L de corante oxi-redutor 2,6 diclorofenol-indofenol

(DCPIP) e 4  $\mu\text{L}$  de cada combustível, distribuído da seguinte maneira: biodiesel palma, mamona, soja, sebo bovino, sebo bovino com soja (B5 e B100) e óleo diesel puro.

Para os testes foram utilizados biodiesel originado da metil-esterificação de óleos de palma, mamona, soja, sebo bovino e sebo bovino com soja, cedidos pelo LAMES/UFG e produzidos por Brasil Eco Diesel e Granol Óleos Vegetais e óleo diesel puro foi cedido pela distribuidora ALE Combustíveis.

O experimento constou de um controle positivo (174  $\mu\text{L}$  meio de cultura mínimo com glucose 0,1%, 20  $\mu\text{L}$  da solução de bactérias e 6  $\mu\text{L}$  corante DCPIP) e um controle negativo (174  $\mu\text{L}$  meio de cultura mínimo, 20  $\mu\text{L}$  da solução de bactérias e 6  $\mu\text{L}$  corante DCPIP).

As placas foram incubadas a 30°C. As primeiras leituras para se verificar a degradação do combustível foram realizadas com 24 e 48 horas e as leituras finais foram realizadas com 7 e 14 dias de incubação.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.4. Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir de todos os isolados crescidos em ágar BHI por 48 horas, seguindo o protocolo proposto por Van Soolingen et al (1994) com modificações.

Duas a três colônias foram retiradas da placa e ressuspendidas em tubos contendo 400  $\mu\text{L}$  de tampão TE com 8  $\mu\text{L}$  de solução de lisozima (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich) e então incubadas em banho-maria por 40 minutos a 37°C. Após este período, foi adicionado ao tubo 70  $\mu\text{L}$  de SDS a 10% e 12  $\mu\text{L}$  de solução de proteinase K (20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich), com nova incubação a 56°C por 10 minutos. Após esta incubação, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de NaCl a 5M seguidos de 80  $\mu\text{L}$  de solução CTAB/NaCl. O tubo foi agitado lentamente até a solução aparentar aspecto leitoso e então novamente incubada por 10 minutos a 65°C.

Em seguida foi adicionado 650  $\mu\text{L}$  de solução de clorofil, sendo o tubo agitado por inversão lenta por 30 segundos, e então submetido à centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA em suspensão foi transferido para outro tubo, precipitado com 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol e após incubação a -20°C por 24 horas. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante

foi descartado e o DNA foi lavado com etanol 70% gelado. Após a secagem o DNA extraído foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de água Mile Q.

A confirmação do processo de extração foi realizada em gel de agarose 1%, utilizando-se uma alíquota de 5  $\mu$ L do material extraído e 1  $\mu$ L de tampão de amostra. O restante do material extraído foi estocado em freezer a -20°C.

### **3.5. Amplificação para a Região Codificante de 16S rDNA por *Polimerase Chain Reaction* (PCR)**

A região do DNA que codifica para o gene 16S rDNA foi amplificada pela reação de polimerase em cadeia (PCR), com os oligonucleotídeos iniciadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') conforme (Weisburg et al 1991) com modificações. As reações foram preparadas para um volume final de 50  $\mu$ L, contendo: 35,5  $\mu$ L de água, 5  $\mu$ L de tampão 10X para a enzima Taq polimerase (Invitrogen), 1,5  $\mu$ L de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (50mM) (Invitrogen), 1  $\mu$ L de solução de cada oligonucleotídeo iniciador (10 $\mu$ M) (Invitrogen), 4  $\mu$ L de solução dNTP (2,5mM) (Ludwig Biotec), 1  $\mu$ L de TAQ polimerase (5U) (Invitrogen) e 1  $\mu$ L de DNA extraído.

A PCR foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos (Garcia 2006). Uma alíquota de 5  $\mu$ L do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1%, junto a 1  $\mu$ L de tampão de amostra (RBC), utilizando-se o marcador molecular de 1Kb (Sharp DNA Ladder Marker RBC).

### **3.6. Purificação dos Produtos da *Polimerase Chain Reaction* (PCR)**

A purificação do produto de PCR foi realizada segundo a metodologia usada por Silva et al (2008), com modificações. O método consistiu de precipitar a solução de produto do PCR com dois volumes de isopropanol 65% (Merck) e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Logo após, seguiu-se uma centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação ocorreu uma lavagem com o mesmo volume de etanol 70% (Merck). Os tubos foram deixados invertidos e secando por 3 horas e ressuspendidos em 20  $\mu$ L de água Mile Q.

### 3.7. Sequenciamento dos Produtos da Amplificação

Todos os produtos da amplificação foram sequenciados utilizando-se o Kit da *Applied Biosystems – ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. O sequenciador utilizado foi o modelo ABI 3130 da *Applied Biosystems*.

As seqüências foram analisadas pelo software *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 e comparadas com as seqüências presentes no banco de dados *GenBank* NCBI ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Isolamento de Bactérias da Mistura Biodiesel/Diesel (B3) e Biodiesel B100 em Tanques de Armazenamento

Um total de 25 isolados foi obtido das amostras de combustível coletadas nos tanques de armazenamento. Desse total, 12 isolados foram obtidos do posto de combustível do setor de transportes da UFG campus Goiânia (Tab. 1) e os outros 13 isolados foram obtidos dos tanques de combustível dos veículos que estavam na oficina com diagnóstico de entupimento da bomba de combustível (Tab. 2). Das amostras de biodiesel B100 cedidas pelo laboratório LAMES/UFG, não se observou nenhum crescimento bacteriano.

**Tabela 1** – Relação das bactérias isoladas do tanque de combustível do posto da UFG campus Goiânia.

Bactérias Isoladas	Coloração de Gram	Morfologia
BTP B1	+	Bacilo
BTP B2	+	Bacilo
BTP B3	+	Bacilo
BTP B4	-	Bastonete
BTP B5	+	Coco
BTP B6	+	Bacilo
BTP B7	-	Bastonete
BTP B8	-	Bastonete
BTP B9	+	Coco
BTP B10	+	Bacilo
BTP B11	+	Bacilo
BTP B12	-	Bastonete

Legenda: BTP = bactéria isolada em tanque de posto.

**Tabela 2** – Relação das bactérias isoladas do tanque de combustível de veículos com defeito na bomba de combustível.

Bactérias Isoladas	Coloração de Gram	Morfologia
BTV A1	+	Bacilo
BTV A2	+	Bacilo
BTV A3	-	Bastonete
BTV A4	+	Bacilo
BTV A5	+	Coco
BTV A6	-	Bastonete
BTV A7	+	Coco
BTV A8	+	Bacilo
BTV A9	+	Coco
BTV A10	+	Bacilo
BTV A11	+	Bacilo
BTV A12	+	Coco
BTV A13	+	Bacilo

Legenda: BTV = bactéria isolada em tanque de veículo.

#### **4.2. Caracterização das Bactérias Pertencentes à Bacterioteca do LAMAB/IPTSP/UFG**

Os 16 isolados bacterianos contidos na bacterioteca do LAMAB/IPTSP/UFG, que segundo Peixoto e Vieira (2006) e Vieira (2007) são degradadoras de óleo diesel, e que foram utilizadas no desenvolvimento desta pesquisa estão discriminadas Tabela 3.

**Tabela 3** - Relação de bactérias pertencentes à bacterioteca LAMAB/IPTSP/UFG

Bactérias Isoladas	Coloração de Gram	Morfologia
BBL C1	+	Bacilo
BBL C2	+	Bacilo
BBL C3	+	Bacilo
BBL C4	+	Bacilo
BBL C5	+	Coco
BBL C6	-	Bastonete
BBL C7	-	Bastonete
BBL C8	+	Bacilo
BBL C9	+	Bacilo
BBL C10	+	Bacilo
BBL C11	+	Bacilo
BBL C12	-	Bastonete
BBL C13	+	Bacilo
BBL C14	+	Bacilo
BBL C15	+	Bacilo
BBL C16	+	Bacilo

Legenda: BBL = bactérias da bacterioteca do LAMAB.

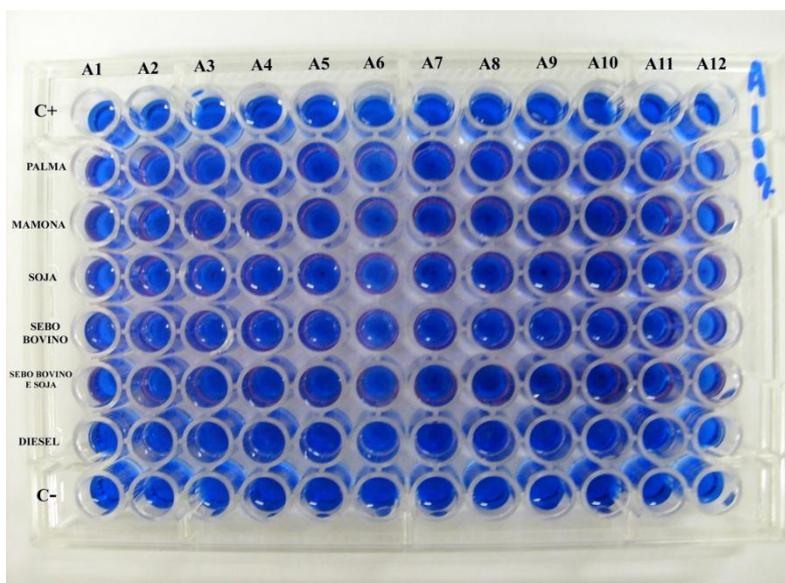
#### **4.3. Determinação em Placa da Capacidade de Biodegradação de Biodiesel B100, Mistura (B5) e Diesel Puro**

Todos os 41 isolados foram testados quanto ao potencial de degradação de biodiesel B5 e B100 e óleo diesel puro. Na Figura 4 observa-se a imagem do início de todos os testes. Na Figura 5 observa-se a imagem do fim dos testes de biodegradação (14 dias) e esta imagem é semelhante ao final de todos os testes.

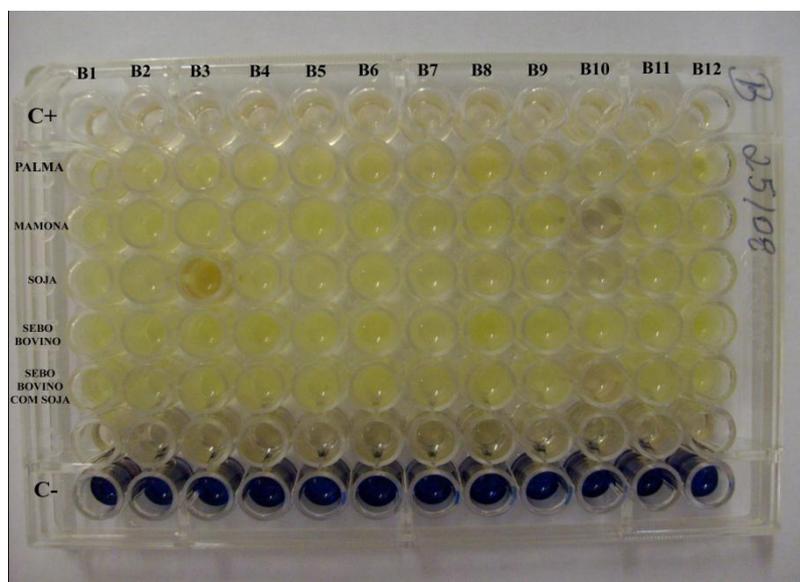
Foram realizadas leituras com 1, 2, 7 e 14 dias após o início dos testes.

Nas leituras realizadas com 1 e 2 dias, não foi observada nenhuma viragem na cor do corante DCPIP nas placas incubadas. Os dados estão representados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. A viragem de cor do corante (descoloração) é indicativo de utilização do combustível como fonte de carbono.

Após 7 dias do início dos testes de biodegradação para o biodiesel B100 e B5 e diesel puro observou-se a viragem de cor do corante (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9).



**Figura 4.** Representação do início dos testes de biodegradação. A imagem apresentada se refere aos isolados BTV no início dos testes com biodiesel B100 e diesel puro. Nas colunas estão os isolados testados e nas linhas estão os testes realizados. C+ = Controle Positivo; Palma, mamona, soja, sebo bovino, sebo bovino com soja e diesel = tipo de combustível testado e C-= controle Negativo.



**Figura 5.** Representação do fim dos testes de biodegradação (14 dias). A imagem apresentada se refere aos isolados BTP no fim dos testes com biodiesel B5. Nas colunas estão os isolados testados e nas linhas estão os testes realizados. C+ = Controle Positivo; Palma, mamona, soja, sebo bovino, sebo bovino com soja = tipo de combustível testado e C-= controle Negativo.

**Tabela 4.** Resultado do teste de biodegradação para B100 e diesel puro após 48 horas.

Isolados	Testes							
	C (+)	Palma	Mamona	Soja	Sebo Bovino	Sebo Bovino com Soja	Diesel Puro	C(-)
BTP B1	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B2	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B3	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B4	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B5	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B6	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B7	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B8	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B9	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B10	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B11	-	-	-	-	-	-	-	-
BTP B12	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A1	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A2	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A3	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A4	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A5	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A6	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A7	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A8	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A9	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A10	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A11	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A12	-	-	-	-	-	-	-	-
BTV A13	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C1	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C2	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C3	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C4	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C5	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C6	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C7	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C8	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C9	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C10	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C11	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C12	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C13	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C14	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C15	-	-	-	-	-	-	-	-
BBL C16	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: C(+) = Controle Positivo; C(-) = Controle Negativo; - = degradação negativa.

**Tabela 5.** Resultado do teste de biodegradação para B5 após 48 horas.

Isolados	Testes						
	C (+)	Palma	Mamona	Soja	Sebo Bovino	Sebo Bovino com Soja	C (-)
BTP B1	-	-	-	-	-	-	-
BTP B2	-	-	-	-	-	-	-
BTP B3	-	-	-	-	-	-	-
BTP B4	-	-	-	-	-	-	-
BTP B5	+	+	+	+	+	+	-
BTP B6	-	-	-	-	-	-	-
BTP B7	-	-	-	-	-	-	-
BTP B8	-	-	-	-	-	-	-
BTP B9	-	-	-	-	-	-	-
BTP B10	-	-	-	-	-	-	-
BTP B11	-	-	-	-	-	-	-
BTP B12	-	-	-	-	-	-	-
BTV A1	-	-	-	-	-	-	-
BTV A2	-	-	-	-	-	-	-
BTV A3	-	-	-	-	-	-	-
BTV A4	-	-	-	-	-	-	-
BTV A5	-	-	-	-	-	-	-
BTV A6	-	-	-	-	-	-	-
BTV A7	-	-	-	-	-	-	-
BTV A8	-	-	-	-	-	-	-
BTV A9	-	-	-	-	-	-	-
BTV A10	-	-	-	-	-	-	-
BTV A11	-	-	-	-	-	-	-
BTV A12	-	-	-	-	-	-	-
BTV A13	-	-	-	-	-	-	-
BBL C1	-	-	-	-	-	-	-
BBL C2	-	-	-	-	-	-	-
BBL C3	-	-	-	-	-	-	-
BBL C4	-	-	-	-	-	-	-
BBL C5	-	-	-	-	-	-	-
BBL C6	-	-	-	-	-	-	-
BBL C7	-	-	-	-	-	-	-
BBL C8	-	-	-	-	-	-	-
BBL C9	-	-	-	-	-	-	-
BBL C10	-	-	-	-	-	-	-
BBL C11	-	-	-	-	-	-	-
BBL C12	-	-	-	-	-	-	-
BBL C13	-	-	-	-	-	-	-
BBL C14	-	-	-	-	-	-	-
BBL C15	-	-	-	-	-	-	-
BBL C16	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: C(+) = Controle Positivo; C(-) = Controle Negativo; - = degradação negativa.

**Tabela 6.** Resultado do teste de biodegradação para B100 e diesel puro após 7 dias.

Isolados	Testes							C (-)
	C (+)	Palma	Mamona	Soja	Sebo Bovino	Sebo Bovino com Soja	Diesel Puro	
BTP B1	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B2	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B3	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B4	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B5	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B6	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B7	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B8	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B9	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B10	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B11	+	-	-	-	-	-	-	-
BTP B12	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A1	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A2	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A3	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A4	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A5	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A6	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A7	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A8	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A9	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A10	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A11	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV A12	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A13	+	+	+	+	+	+	-	-
BBL C1	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C2	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C3	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C4	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C5	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C6	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C7	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C8	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C9	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C10	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C11	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C12	+	-	-	-	-	-	-	-
BBL C13	+	+	+	+	+	+	-	-
BBL C14	+	+	+	+	+	+	-	-
BBL C15	+	+	+	+	+	+	-	-
BBL C16	+	+	+	+	+	+	-	-

Legenda: C(+) = Controle Positivo; C(-) = Controle Negativo; - = degradação negativa.

**Tabela 7.** Resultado do teste de biodegradação para B5 após 7 dias.

Isolados	Testes						
	C (+)	Palma	Mamona	Soja	Sebo Bovino	Sebo Bovino com Soja	C(-)
BTP B1	+	-	-	-	-	-	-
BTP B2	+	-	-	-	-	-	-
BTP B3	+	-	-	-	-	-	-
BTP B4	+	-	-	-	-	-	-
BTP B5	+	+	+	+	+	+	-
BTP B6	+	-	-	-	-	-	-
BTP B7	+	-	-	-	-	-	-
BTP B8	+	-	-	-	-	-	-
BTP B9	+	+	+	+	+	+	-
BTP B10	+	-	-	-	-	-	-
BTP B11	+	-	-	-	-	-	-
BTP B12	+	+	+	+	+	+	-
BTV A1	+	-	-	-	-	-	-
BTV A2	+	-	-	-	-	-	-
BTV A3	+	-	-	-	-	-	-
BTV A4	+	-	-	-	-	-	-
BTV A5	+	-	-	-	-	-	-
BTV A6	+	-	-	-	-	-	-
BTV A7	+	-	-	-	-	-	-
BTV A8	+	-	-	-	-	-	-
BTV A9	+	-	-	-	-	-	-
BTV A10	+	+	+	+	+	+	-
BTV A11	+	-	-	-	-	-	-
BTV A12	+	+	+	+	+	+	-
BTV A13	+	-	-	-	-	-	-
BBL C1	+	-	-	-	-	-	-
BBL C2	+	-	-	-	-	-	-
BBL C3	+	-	-	-	-	-	-
BBL C4	+	-	-	-	-	-	-
BBL C5	+	-	-	-	-	-	-
BBL C6	+	-	-	-	-	-	-
BBL C7	+	-	-	-	-	-	-
BBL C8	+	-	-	-	-	-	-
BBL C9	+	-	-	-	-	-	-
BBL C10	+	-	-	-	-	-	-
BBL C11	+	-	-	-	-	-	-
BBL C12	+	-	-	-	-	-	-
BBL C13	+	+	+	+	+	+	-
BBL C14	+	-	-	-	-	-	-
BBL C15	+	-	-	-	-	-	-
BBL C16	+	-	-	-	-	-	-

Legenda: C(+) = Controle Positivo; C(-) = Controle Negativo; - = degradação negativa.

**Tabela 8.** Resultado do teste de biodegradação para B100 e diesel puro após 14 dias.

Isolados	Testes							
	C (+)	Palma	Mamona	Soja	Sebo Bovino	Sebo Bovino com Soja	Diesel Puro	C (-)
BTP B1	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B2	+	+	+	+	+	+	+	-
BTP B3	+	+	+	+	+	+	+	-
BTP B4	+	+	+	+	+	+	+	-
BTP B5	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B6	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B7	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B8	+	+	+	+	+	+	-	-
BTP B9	+	+	+	+	+	+	+	-
BTP B10	+	+	+	+	+	+	+	-
BTP B11	+	+	+	+	+	+	+	-
BTP B12	+	+	+	+	+	+	+	-
BTV A1	+	+	+	+	+	+	+	-
BTV A2	+	+	+	+	+	+	+	-
BTV A3	+	+	+	+	+	+	+	-
BTV A4	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A5	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A6	+	+	+	+	+	+	+	-
BTV A7	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A8	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A9	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A10	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A11	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A12	+	+	+	+	+	+	-	-
BTV A13	+	+	+	+	+	+	-	-
BBL C1	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C2	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C3	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C4	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C5	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C6	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C7	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C8	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C9	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C10	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C11	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C12	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C13	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C14	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C15	+	+	+	+	+	+	+	-
BBL C16	+	+	+	+	+	+	+	-

Legenda: C(+) = Controle Positivo; C(-) = Controle Negativo; - = degradação negativa.

**Tabela 9.** Resultado do teste de biodegradação para B5 após 14 dias.

Isolados	Testes						
	C (+)	Palma	Mamona	Soja	Sebo Bovino	Sebo Bovino com Soja	C (-)
BTP B1	+	+	+	+	+	+	-
BTP B2	+	+	+	+	+	+	-
BTP B3	+	+	+	+	+	+	-
BTP B4	+	+	+	+	+	+	-
BTP B5	+	+	+	+	+	+	-
BTP B6	+	+	+	+	+	+	-
BTP B7	+	+	+	+	+	+	-
BTP B8	+	+	+	+	+	+	-
BTP B9	+	+	+	+	+	+	-
BTP B10	+	+	+	+	+	+	-
BTP B11	+	+	+	+	+	+	-
BTP B12	+	+	+	+	+	+	-
BTV A1	+	+	+	+	+	+	-
BTV A2	+	+	+	+	+	+	-
BTV A3	+	+	+	+	+	+	-
BTV A4	+	+	+	+	+	+	-
BTV A5	+	+	+	+	+	+	-
BTV A6	+	+	+	+	+	+	-
BTV A7	+	+	+	+	+	+	-
BTV A8	+	+	+	+	+	+	-
BTV A9	+	+	+	+	+	+	-
BTV A10	+	+	+	+	+	+	-
BTV A11	+	+	+	+	+	+	-
BTV A12	+	+	+	+	+	+	-
BTV A13	+	+	+	+	+	+	-
BBL C1	+	+	+	+	+	+	-
BBL C2	+	+	+	+	+	+	-
BBL C3	+	-	-	-	-	-	-
BBL C4	+	-	-	-	-	-	-
BBL C5	+	-	-	-	-	-	-
BBL C6	+	-	-	-	-	-	-
BBL C7	+	+	+	+	+	+	-
BBL C8	+	-	-	-	-	-	-
BBL C9	+	-	-	-	-	-	-
BBL C10	-	-	-	-	-	-	-
BBL C11	+	-	-	-	-	-	-
BBL C12	+	-	-	-	-	-	-
BBL C13	+	+	+	+	+	+	-
BBL C14	+	+	+	+	+	+	-
BBL C15	+	+	+	+	+	+	-
BBL C16	+	+	+	+	+	+	-

Legenda: C(+) = Controle Positivo; C(-) = Controle Negativo; - = degradação negativa.

Pode-se observar que a grande maioria dos isolados iniciou o processo de degradação da mistura de biodiesel (B5), biodiesel puro (B100) e diesel puro após 7 dias do início dos testes (Tabelas 6, 7, 8 e 9).

Entre os isolados testados neste trabalho, observo-se que com 48 horas de testes, os isolados BTP B12 e BTP B5 oxidaram o corante DCPIP para todas as amostras de biodiesel, B100 e B5 respectivamente, analisadas. O diesel puro permanecia como no início dos testes, sem oxidação.

Após uma semana (7 dias), observamos que no teste com o combustível puro (B100 e diesel), os isolados BTP B7, BTP B8, BTP B9, BTP B12, BTV A12, BTV A13, BBL C13, BBL C14, BBL C15 e BBL C16 oxidaram o corante DCPIP para todas as amostras de biodiesel B100 analisadas. O diesel puro permanecia como no início dos testes, sem oxidação. No teste com as misturas de B5 observamos que os isolados BTP B5, BTP B9, BTP B12, BTV A10, BTV A12 e BBL C13 haviam oxidado o corante DCPIP em todos os biodieseis analisados.

Após duas semanas (14 dias), foi realizada a leitura final dos testes de biodegradação. Os isolados BTP B2, BTP B3, BTP B4, BTP B9, BTP B10, BTP B11, BTP B12, BTV A1, BTV A2, BTV A3, BTV A6 e todos os isolados BBL (C1 até C16), haviam oxidado o corante DCPIP para todos os combustíveis analisados, B100 e diesel puro. Já os isolados BTP B1, BTP B5, BTP B6, BTP B7, BTP B8, BTV A4, BTV A5, BTV A7, BTV A8, BTV A9, BTV A10 BTV A11, BTV A12, BTV A13 não oxidaram o corante DCPIP para o teste do diesel puro.

Nos testes referentes à análise de biodegradação do biodiesel B5, todos os isolados BTP (B1 até B12), todos os isolados BTV (A1 até A13) e os isolados BBL C1, BBL C2, BBL C7, BBL C13, BBL C14, BBL C15 e BBL C16 oxidaram o corante DCPIP para os biodieseis analisados.

#### **4.4 Análise do Sequenciamento**

Os dados obtidos do sequenciamento foram comparados com os contidos no banco de dados do *GenBank* NCBI e estão representados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Identificação dos isolados por comparação das sequências no banco de dados *GenBank*.

Isolado	Resultado BLAST	Nº de acesso	% Identidade
BTP B1	<i>Bacillus vallismortis</i>	<b>URWXM0RV01S</b>	97
BTP B2	<i>Bacillus vallismortis</i>	<b>US8DVVKA01S</b>	97
BTP B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	<b>US8PJA4W01N</b>	99
BTP B4	Não identificado	*	*
BTP B5	Não identificado	*	*
BTP B6	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>US92741D01S</b>	99
BTP B7	Não identificado	*	*
BTP B8	Não identificado	*	*
BTP B9	Não identificado	*	*
BTP B10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<b>US9DEMMJ01N</b>	99
BTP B11	<i>Bacillus licheniformis</i>	<b>US9M2G8001N</b>	89
BTP B12	Não identificado	*	*
BTV A1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>URJPB04401N</b>	99
BTV A2	Não identificado	*	*
BTV A3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<b>URJBKHYR01N</b>	99
BTV A4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<b>URK41F4D01N</b>	97
BTV A5	<i>Kocuria palustris</i>	<b>URPZ17N701N</b>	97
BTV A6	Não identificado	*	*
BTV A7	<i>Staphylococcus sp.</i>	<b>URUP9R5E01N</b>	99
BTV A8	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<b>URV0HNA101N</b>	99
BTV A9	<i>Staphylococcus capitis</i>	<b>URVA6GM401N</b>	99
BTV A10	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<b>URVM102201N</b>	99
BTV A11	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>URVXEA8501S</b>	99
BTV A12	<i>Staphylococcus sp.</i>	<b>URW5Y1H301S</b>	99
BTV A13	<i>Bacillus subtilis</i>	<b>UTD72F5P01S</b>	99
BBL C1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>US9XK7GD01N</b>	99
BBL C2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTA0U9BP012</b>	100
BBL C3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<b>UTA97RRK013</b>	100
BBL C4	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTAGK3V201N</b>	99
BBL C5	Não identificado	*	*
BBL C6	Não identificado	*	*
BBL C7	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<b>UTAV8AEW016</b>	83
BBL C8	<i>Bacillus licheniformis</i>	<b>UTB6EKHZ013</b>	100
BBL C9	Não identificado	*	*
BBL C10	<i>Bacillus subtilis</i>	<b>UTBKV0AT016</b>	100
BBL C11	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTCU6YSZ016</b>	100
BBL C12	Não identificado	*	*
BBL C13	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTE0TCGH013</b>	97
BBL C14	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTEBS65W01S</b>	99
BBL C15	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTEH4FRN012</b>	100
BBL C16	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<b>UTEM9GF9013</b>	100

Após o sequenciamento da região 16S rDNA dos isolados, 29 destes foram identificados: *Bacillus valismortis* (BTP B1 e B2), *B. licheniformis* (BTP B3, B11 e BBL C8); *B. thuringiensis* (BTP B10), *B. amyloliquefaciens* (BTV A4 e BBL C3), *B. fusiformis* (BTV A8 e A10), *B. subtilis* (BTV A13 e BBL C10); *Lysinibacillus sphaericus* (BTP B6, BTV A1 e A11, BBL C1, C2, C4, C11, C13, C14, C15 e C16); *Staphylococcus sp.* (BTV A7 e A12), *S. capitis* (BTV A9); *Kocuria palustris* (BTV A5); *Citrobacter amalonaticus* (BBL C7); *Stenotrophomonas maltophilia* (BTV A3).

## 5. DISCUSSÃO

Diversas pesquisas têm sido realizadas para provir uma fonte alternativa e eficiente em substituição ao óleo diesel, que seja de baixo impacto ambiental e economicamente viável. O metanol, etanol, gás natural e a eletricidade têm sido apresentados como alternativas promissoras, entretanto requerem mudanças extensivas nos equipamentos movidos a óleo diesel (Newman 1993). Uma alternativa econômica e ecologicamente viável para sua substituição é o biodiesel. Os aspectos positivos do biodiesel são seu processo simples de produção, a utilização de seus co-produtos em outras rotas industriais, a capacidade de ser produzido a partir de óleos vegetais e rejeitos agropecuários e domésticos, demonstrando a habilidade de produção de energia renovável e reduzindo a dependência do petróleo (Follis 1994).

Um dos aspectos mais interessantes do biodiesel é sua biodegradabilidade. O biodiesel é considerado biodegradável baseado nos estudos de sua demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e a produção de CO<sub>2</sub>, quando utilizado como fonte única de carbono. Entretanto, os estudos de biodegradação não determinam quais as condições ambientais necessárias à mesma, os subprodutos gerados, a velocidade de biodegradação e os micro-organismos envolvidos no processo. Pesquisas tendo como foco a biodegradação de biodiesel estão na sua infância ao contrário da biodegradação do petróleo, diesel e outros derivados nos quais os estudos estão muito bem definidos (Follis 1994).

Neste estudo, obtivemos diferentes morfologias bacterianas isoladas de diferentes ambientes de armazenamento de biodiesel (tanques de armazenamento em posto de combustível e tanques de armazenamento dos veículos).

Observa-se que algumas das bactérias identificadas neste trabalho foram descritas em outras pesquisas de isolamento de microrganismos presentes em diferentes tipos de combustíveis (Gaylarde et al 1999 e Rauch et al 2006). Estes autores encontraram diferentes espécies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*), *Staphylococcus capitis* e *Kocuria sp.* contaminando tanques de armazenamento de diferentes tipos de combustíveis. Segundo estes autores, o crescimento microbiano em tanques de estocagem pode causar entupimento de filtros, corrosão de peças e aumentos nos custos de manutenção. Rauch et al (2006) relata o caso da queda de um avião B-52 na década de 1950, causada pelo entupimento microbiano dos injetores de combustível.

O conhecimento e a identificação de microrganismos, frequentemente, presentes nos tanques de armazenamento é uma ferramenta importante para a predição dos processos do potencial de deterioração do combustível por bactérias e a utilização de inibidores das mesmas (Gaylarde et al 1999; Rauch et al 2006).

Nenhuma bactéria foi isolada das amostras de biodiesel B100 (obtidas direto da produção). Este fato sugere que a contaminação pode ocorrer na fase de transporte deste biodiesel até as distribuidoras de combustível ou no momento em que é feita a mistura diesel/biodiesel, na distribuidora.

Um segundo ponto de contaminação pode ocorrer na fase de transporte desta mistura até os postos de venda ou no momento em que esta mistura é transferida do caminhão tanque para o tanque de armazenamento dos postos que distribuem este combustível ao consumidor final. A abertura do tanque de armazenamento nos postos de combustível por onde se faz o descarregamento deste combustível vindo da distribuidora se encontra ao mesmo nível do solo. Neste ponto de transferência a poeira do local ou solo bem como resíduos sólidos e líquidos podem vir a cair dentro do tanque de armazenamento, levando junto os contaminantes biológicos.

Outro fato que pode justificar a grande contaminação bacteriana notada nos combustíveis dos veículos automotores que estavam na oficina com diagnóstico de entupimento da bomba de combustível é o fato destes veículos terem, em sua grande maioria, os tanques de armazenamento do combustível situados na parte externa do veículo possibilitando assim um maior contato da abertura do tanque com o ambiente externo. Esse acúmulo de resíduos na abertura do tanque pode vir a ter contato com o combustível no momento do reabastecimento, levando a contaminação para dentro do tanque. O óleo diesel e também o biodiesel são substâncias higroscópicas. Esta absorção de água com a consequente formação de uma bicamada nos tanques auxilia a formação de um biofilme microbiano levando a degradação e conseqüentemente um comprometimento da qualidade dos combustíveis (Follis, 1994).

Testes rápidos para a detecção da degradação microbiológica de combustíveis são de grande interesse. Um teste de grande rapidez e facilidade de execução é baseado na reação de redução do DCPIP ocasionando sua descoloração. Este indicador redox (DCPIP) foi utilizado em diversas pesquisas (Hanson et al 1993; Peixoto & Vieira 2005; Mariano et al 2007; Carvalhaes 2009).

Peixoto & Vieira (2005) sugerem que o teste em placa utilizando DCPIP é um método de triagem de microrganismos com capacidade degradativa simples e de baixo

custo, podendo ser amplamente padronizado e utilizado para detecção da degradação de compostos de interesse.

O período de tempo utilizado para a leitura dos testes de determinação da biodegradação do biodiesel, 7 e 14 dias, seguiu a metodologia descrita por Follis (1994). Segundo este autor em seu estudo sobre a degradação de óleo diesel sob várias condições ambientais, a degradação de combustíveis por bactérias devem ser analisadas em períodos de 7 e 14 dias, tempo necessário para que as bactérias ativem genes que produzam as enzimas esterase e lipase. Conforme Lapinskiene et al (2007), em suas pesquisas, o biodiesel é formado basicamente por ésteres e ácidos graxos, sendo dessa forma substrato para que as enzimas esterase e lipases possam atuar.

Ao final do período de testes (14 dias) observou-se que as bactérias testadas apresentavam um perfil de degradação diferenciado quando comparadas com os resultados obtidos após 48 horas de testes (Tabelas 4, 5, 8 e 9). Segundo Leung et al (2006) vários fatores ambientais podem influenciar no processo de degradação do biodiesel, entre eles podemos citar a temperatura, presença de O<sub>2</sub> e água. Este mesmo autor percebeu que o biodiesel após 52 semanas de armazenamento começava a sofrer degradação por estas condições abióticas e que a ação microbiológica poderia acelerar o processo.

As bactérias isoladas dos tanques de armazenamento apresentaram um perfil de degradação diferenciado em relação às bactérias pertencentes à bacterioteca do LAMAB. A maioria das bactérias isoladas dos tanques de armazenamento (14 isolados) não degradaram diesel puro, este fato pode ser explicado pelo diesel puro ser mais complexo em sua composição química que o biodiesel. A maioria das cepas pertencentes a bacterioteca do LAMAB não conseguiram degradar a mistura de biodiesel (B5), isto se explica pelo fato de que a mistura diesel/biodiesel pode gerar algum composto que retarde a ação de enzimas bacterianas responsáveis pela degradação do combustível. A elucidação destes fatos poderá ser comprovada por testes de cromatografia.

Neste estudo identificamos as bactérias isoladas por sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (16S rDNA), esta região possui sequências de nucleotídeos hipervariáveis seguidas por sequências altamente conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Os métodos bioquímicos tradicionais de identificação não foram usados pelo fato de não se saber os possíveis gêneros

bacterianos que estavam envolvidos no processo de degradação dos combustíveis analisados.

Em 12 dos isolados (Tabelas 12, 13 e 14) não foi possível fazer a identificação. Este fato é devido à baixa qualidade do material obtido no final do processo de purificação do DNA dos isolados.

A espécie *B. valismortis* foi originalmente isolada em solos do Vale da Morte, Califórnia (Estados Unidos) em 1996. Esta espécie está relacionada ao *B. subtilis* diferenciando desta pela composição dos ácidos graxos que formam a parede celular, pela sequência de DNA e pelo nível de rearranjo do DNA genômico (Roberts 1996).

A espécie *Lysinibacillus sphaericus* originalmente chamada por *Bacillus sphaericus* foi renomeada no ano de 2007 por Ahmed et al (2007).

A espécie *S. capitis* foi originalmente isolada da pele de pessoas nos estados da Carolina do Norte e Nova Jersey nos Estados Unidos (Kloss et al 1975). A contaminação do biodiesel por esta bactéria pode ter ocorrido durante algum processo de manipulação do combustível.

A espécie *Kocuria palustris* é uma espécie nova, isolada em 1999 de rizosfera da *Typha angustifolia*, uma planta aquática encontrada no rio Danúbio na Hungria (Kovács et al 1999).

## 6. CONCLUSÕES

- Foram isoladas bactérias dos combustíveis (B3) coletados dos tanques de armazenamento do posto de combustível do setor de transportes da UFG e dos tanques dos veículos automotores que estavam na oficina com diagnóstico de entupimento da bomba de combustível. Nenhuma bactéria foi isolada das amostras de biodiesel B100 obtido direto da produção. Estes resultados sugerem que há uma contaminação nos tanques de armazenamento.
- Após duas semanas de testes de biodegradação das 41 bactérias testadas (25 isoladas de tanques de armazenamento e 16 pertencentes à bacterioteca do LAMAB/UFG) todas degradaram o biodiesel B100, 32 degradaram o biodiesel B5 e 27 degradaram diesel puro.
- Observou-se uma reduzida diversidade bacteriana composta por *Bacillus valismortis*, *B. licheniformis*; *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. fusiformis*, *B. subtilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Staphylococcus sp.*, *S. capitis*, *Kocuria palustris*, *Citrobacter amalonaticus* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

## 7. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T 2006. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiology* 57: 1117–1125.

Alexander M 1999. Biodegradation and bioremediation. *Waste Manag Res* 17: 390-391.

ANFAVEA - Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br>>. Acessado em 08/08/2009.

ANP - Agência Nacional do Petróleo. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em 02/12/2009.

Armann RI, Ludwig W 2000. Ribossomal RNA – targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *Microbiol Rev* 24: 555-565.

Bento FM, Camargo FAO, Okeke B 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz J of Microbiol* 34 (Suppl.1): 65-68.

Bernoth L, Firth I, McAllister P, Rhodes S 2000. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. *Min. Biotechnol* 17 (2): 105-111.

Biodiesel – Porta Brasileiro do Biodiesel. Disponível em:<<http://www.biodiesel.gov.br>>.Acessado em 08/08/2009.

Biodiesel Brasil - BiodieselBR. Disponível em:< <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/historia/biodiesel-historia.htm>>. Acessado em 08/08/2009

Blackman WCJr 1996. Basic Hazardous, 2<sup>nd</sup> ed., Waste Management, Boca Raton, FL, USA, 397 pp.

Carvalhaes NO 2009. Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados. Dissertação de Mestrado 95p 2009 UFG [unpublished observations].

Chelius MK, Triplett EW 2001. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol* 41: 252-263.

Chowdhury J, Foury K 1993. Vegetable oils: from table to gas tank. *Chem Eng J* p35-39.

Climatempo – Climatempo. Disponível em: <<http://www.climatempo.com.br>>. Acessado 15/12/2009.

Cole GM. 1994. *Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites*. Boca Raton, FL, USA, 360pp.

Cunha CD, Leite SGF 2000. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Braz J Microbiol* 31: 45-49.

DEMEC - Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.demec.ufmg.br/disciplinas/ema003/liquidos/diesel/especifici.htm>>. Acessado em 08/10/2009].

Derakshani M, Lukow T, Liesack W 2001. Novel bacterial lineages at the (sub) division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rDNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol* 67: 623-631.

Follis PA editor. *An Investigation into the biodegradability of soy diesel under various environmental conditions* [masters thesis]. Dusquesne: School of Natural and Environmental Sciences, Dusquesne University; 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>.

Furigo AJr, Vaz EAC, Gonçalves ELT, Gauer FR, Tombesi GC editors. *Biorremediação de Solos* [monograph on the Internet]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006 [acesso 02/04/2010]. Disponível em: <<http://www.enq.ufsc.br/...2/biorremediacao/biorremediacao.doc>>.

Garcia CE editor. *Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e seqüenciamento da região 16S rRNA* [monograph on the Internet]. Campinas: Universidade de Campinas UNICAMP; 2006. Disponível em: <<http://lakh.unm.edu/handle/10229/53536>>.

Gaylarde CC, Bento FM, Kelley J 1999. Microbial Contamination of Stored Hydrocarbon Fuels and its Control. *Rev Microbiol* 30: 1-10.

Gutnick DL, Rosemberg E 1977. Oil Tankers and pollution: a microbiological approach. *Annu Rev Microbiol* 31: 379-96.

Hanson KG, Desai JD, Desai AJ. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol Tech* [1573-6784]. 1993; 7: 745-748.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em :< [http://www.ibama.gov.br/fauna/legislacao/lei\\_9605\\_98.pdf](http://www.ibama.gov.br/fauna/legislacao/lei_9605_98.pdf)>. Acessado em 30/03/2010.

IEA-SP - Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=10115>>. Acessado 08/08/2009.

Isigüir A, Karaosmanoglu F, Askoy HÁ, Hamdullahpur F, Gulder, OL 1993. Sunflower seed oil of Turkish origin as a diesel fuel alternative. *Appl Biochem Biotechnol* 41: 89-509.

Kataoka APAG editor. *Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”* [monograph on the Internet]. Rio Claro: Universidade Estadual de São Paulo; 2001 [acesso 02/04/2010]. Disponível em: <[http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/id/17184424.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/17184424.html)>.

Kloss WE, Schleifer KH 1975. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. *Int J Syst Bacteriol* 25: 62-79.

Kovács G, Burghardt J, Pradella S, Schumann P, Stackebrandt E, Máriaigetű K 1999. *Kocuria palustris* sp. nov, and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int J Syst Bacteriol* 49: 167-173.

Lambais MR, Cury JC, Maluche-Baretta C, Bull RC. 2005. Diversidade Microbiana dos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: Tópicos em ciência do solo, Vidal-Torrado, P.; Alleoni, L.R.F.; Cooper, M.; Silva, A.P. & Cardoso, E.J, Viçosa, v.4, p.43-84.

Lapinskienė A, Martinkus P 2007. Research on Anaerobic Biodegradation of Fats, Biodiesel Fuel and Diesel Fuel in Soil Medium. *Environ Res, Engin Manag* 39: 30-37.

Leahy JG, Colwell R 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microb Rev* 54:305-315.

Leung DY, Koo BCP, Guo Y 2006. Degradation of biodiesel under different storage conditions. *Bioresour Technol* 97: 250–256.

Lidderdale T 1993. Demand, supply, and price outlook of low-sulfur diesel fuel. In, Energy Information Administration. Short-term energy outlook annual supplement.

Liu S, Sulita M 1994. Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*. *J Ind Microbiol* 13: 321-327.

Mariano AP, Bonotto DM, Angelis DF. Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminadas com Óleo Diesel. Tese de Doutorado. Disponível em: <[www.anp.gov.br/.../Adriano-Pinto-Mariano\\_PRH05\\_UNESP\\_D.pdf](http://www.anp.gov.br/.../Adriano-Pinto-Mariano_PRH05_UNESP_D.pdf)>. Acesso em 30 de março de 2010.

Meloan CE, Pomeranz Y (1973), Food Analysis Laboratory Experiment. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut (USA), pp 116-117.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Disponível em; <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acessado 30/03/2010.

Mulligan CN, Young RN, Gibbs BF 2001. Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng Geol.* 60: 371-380.

Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rDNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.

Natural Academy of Sciences 1985. Oil in sea – inputs, fates, and effects. National Academy Press, Washington, D.C.

Newman A 1993. Growing your own diesel fuel. *Environ Science Technol* 27: 427.

Oliveira E editor. Contaminação de Aquíferos por Hidrocarbonetos Provenientes de Vazamentos de Tanques de Armazenamento Subterrâneo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Instituto de Geociências – USP; 2001. Disponível em: <<http://www.igc.usp.br>>.

Øverås L, Forney L, Daae FL, Torsvik V 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevanmet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 3367-3373.

Peixoto RM, Vieira JDG 2006. Use of 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) for selection of Petroleum and derivatives degrading bacteria, (submitted to *Brazilian Journal of Biology*).

Quarels J, Lewis HW 1990. The new clean air act: a guide to the Clean Air Program as Amended in 1990. Morgan, Lewis, and Bockius, Washington, D.C.

Rahman KSM, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol* 90:159-168.

Rauch ME, Graef HW, Rozenzhak SM, Jones SE, Bleckmann CA, Kruger RL, Naik RR, Stone MO 2006. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *J.Ind. Microbiol Biotechnol* 29: 36.

Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a Close Relative of *Bacillus subtilis*, Isolated from Soil in Death Valley, California. *Int J Syst Bacteriol* p. 470-475.

Rosato YB 1997. Biodegradação de Petróleo. In: Melo IS, Azevedo JL, *Microbiologia Ambiental*. (ed). Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 307-334 440.

Rudell B, Sandstrom T, Hammarstrom U, Ledin ML, Gorstedt P, Stjernberg N 1994. Evaluation of an exposure setup for studying affects of diesel exhaust in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 66: 77-83.

Sayler GS, Shields MS, Tedford ET, Breen A, Hooper SW, SirotkinI KM, Davis JW 1985. Application of DNA-DNA Colony Hybridization to the Detection of Catabolic Genotypes in Environmental Samples *Appl. and Environ. Microb.* 49: 1295-1303

Sierra GA 1957. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck* 28, 15-22.

Silva NA, Villela PMS, Boschiero C, Andrade JLF, Coutinho LL. Método alternativo de purificação de produto de PCR para seqüenciamento. *Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética* 54:409p, 2008.

Soriano AU 2000. Tratamento de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Relatório de atividades apresentado ao CNPq, para Renovação de Bolsa

Modalidade RD, Processo nº300479/99-9, Área - Engenharia Química (cadastro na biblioteca do CETEM/MCT como Relatório Técnico - RT43/2000).

Suflita JM, Concannon F (1995) Screening tests for assessing the anaerobic biodegradation of pollutant chemicals in subsurface environments. *Journal of microbiological methods*, 21:267-281.

TecBio – TecBio. Disponível em: <<http://www.tecbio.com.br>>. Acessado em 08/09/2009.

Torsvik V, Øverås L 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, London, v.5, p. 240-245.

Tótola MR, Chaer GM 2002. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: Álvares V, V.H.; Schaefer, C.E.G.R; Barros, N.F.; Melo, J.W.V.; Costa, L.M. (Ed.). *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.2, p. 195-276.

Trindade PVO 2002. Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo [tese mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, p127.

Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235: 196-205.

Vieira TM, Lima MF, Peixoto RM, Vieira JDG 2007. Utilização de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em Teste Rápido de caracterização de Potenciais Biodegradadores de Biodiesel. CD dos anais do II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. 1-5p.

Wang X, Bartha R 1990. Effects of biorremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *New Brunswick, Soil biology and biochemistry*, v.22, 501-505.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Gene-Trak DJL 1991. 16S ribossomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173 (2): 697-703. In: Garcia CE 2006. Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e seqüenciamento da região 16S rRNA. Tese de Doutorado, UNICAMP.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Composição Química dos meios de cultura e reagentes

#### 8.1.1. Meio mínimo com glucose para testes de biodegradação

NaCl .....	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1%
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0,02%
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,1%
KNO <sub>2</sub> .....	0,3%
Glucose.....	0,1%

#### 8.1.2. Meio mínimo para testes de biodegradação

NaCl .....	0,5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,1%
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,02%
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,1%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,1%
KNO <sub>2</sub> .....	0,3%

#### 8.1.3. Corante DCPIP para testes de biodegradação (Meloan e Pamerans 1973)

Sal Sódico (Diclorofenol-2,6-Indofenol).....	25mg
NaHCO <sub>3</sub> .....	21mg
Água destilada e autoclavada.....	125mL

Após dissolver os sais, filtrar a solução em membrana milipore e armazenar em frasco âmbar autoclavado.

#### 8.1.4. Controle Positivo do teste de biodegradação

Meio Mínimo com glucose .....	172µL
DCPIP.....	10µL
Suspensão bacteriana.....	20µL

### 8.1.5. Controle Negativo do teste de biodegradação

Meio Mínimo.....	172µL
DCPIP.....	10µL
Suspensão bacteriana.....	20µL

### 8.1.6. Testes de biodegradação

Meio Mínimo.....	172µL
DCPIP.....	10µL
Suspensão bacteriana.....	20µL
Fonte de carbono (biodiesel ou óleo diesel) .....	2µL

A fonte de carbono será a mistura do biodiesel/diesel na proporção 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20% e 100% de biodiesel bem como também na ausência total deste, ou seja, 100% de diesel.

As fontes de carbono utilizadas foram biodiesel de Soja, Mamona, Palma, Sebo Bovino, Sebo bovino com soja e Diesel puro.

### 8.1.7. Tris HCl 1M

Tris base.....	121,1g
H <sub>2</sub> O pura q.s.p. ....	1000mL

Dissolver o Tris em aproximadamente 800 mL de água, ajustar o pH para 7,5 com HCl concentrado, e então completar para o volume final 1000 mL.

### 8.1.8. Solução de EDTA 0,5M pH8

EDTA .....	9,3g
NaOH .....	1g
H <sub>2</sub> O pura q.s.p. ....	50mL

Ajustar o pH para 8 com NaOH.

### 8.1.9. Tampão TE

Tris HCl 10mM .....	1mL
EDTA 1mM .....	200µL

H<sub>2</sub>O pura q.s.p. ....100mL

#### **8.1.10. SDS 10% (duodecil sulfato de sódio)**

SDS .....10g

H<sub>2</sub>O pura q.s.p. ....100mL

Dissolver o SDS em 80 mL de água aquecida. Após o resfriamento, completar o volume para 100 mL e estocar em temperatura ambiente.

#### **8.1.11. Solução NaCl 5M**

NaCl .....292,24g

H<sub>2</sub>O pura q.s.p. ....1000mL

#### **8.1.12. Solução CTAB/NaCl**

A solução CTAB/NaCl é feita utilizando 10%CTAB acrescido a 0,73M NaCl.

#### **8.1.13. Clorofil**

A solução clorofil é feita a partir de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v/v).

#### **8.1.14. Tampão TBE 10X (Tris Ácido Bórico)**

Tris base .....54g

Ácido

Bórico.....27,5g

Solução EDTA 0,5M pH 8,0 .....20mL

H<sub>2</sub>O pura q.s.p. ....500mL

#### **8.1.15. Gel de agarose 1%**

Agarose .....2g

Tampão TBE 1X .....200mL

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)