

GISLAINE SANTOS DA SILVA

BIODEGRADABILIDADE DO BIODIESEL EM EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS
COM SOLO DE FLORESTA TROPICAL DO SUL DA BAHIA-BRASIL

ILHÉUS-BAHIA
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DE
MICRORGANISMOS

GISLAINE SANTOS DA SILVA

BIODEGRADABILIDADE DO BIODIESEL EM EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS
COM SOLO DE FLORESTA TROPICAL DO SUL DA BAHIA-BRASIL

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos.

Orientadora: Dr^a. Rachel Passos Rezende.
Co-Orientador: Dr. João Carlos Teixeira Dias.

ILHÉUS-BAHIA
2010

Silva, G.S. Biodegradabilidade do Biodiesel em experimentos de microcosmos com solo de floresta tropical do Sul da Bahia-Brasil. Ilhéus (BA), 2010. 63 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Gross

Prof. Dr. Humberto Muniz

Prof^ª. Dr^ª. Rachel Passos Rezende
Orientadora e Presidente da Banca

ILHÉUS-BAHIA
2010

É com amor, respeito e gratidão que dedico este trabalho,
primeiramente a Deus, a Rachel, e a meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, pela graça concedida. O favor que não mereço Ele me concedeu, por isso sou grata ao meu Senhor...

Agradeço de uma forma muito especial a Prof^a Rachel Passos Rezende, primeiro pela oportunidade e pela confiança, pela orientação e apoio sempre presentes, pelo exemplo de humildade e competência, pela sua amizade e carinho. Agradeço pelo privilégio de tê-la conhecido...

Agradeço ao Prof. João Dias, por sempre estar disposto a ajudar, pelos conselhos, pelos “puxões de orelha”, por ser esse professor sempre acessível aos alunos e que nos incentiva a sonhar alto...

Agradeço a meus pais, Valter e Iraci, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os meus projetos de vida, que sempre lutaram pela minha felicidade. Sou grata a vocês...

Agradeço a Denise, por ter sido minha parceira durante esses dois anos de curso, por ter me ajudado em momentos de dificuldade, pelos conselhos e por ser essa pessoa tão admirável...

Agradeço ao Thales, que juntamente com Denise, me deram o privilégio de desfrutar de momentos agradáveis e divertidos durante essa jornada. Obrigada pela amizade de vocês...

Agradeço a todos os colegas, amigos e afins que fizeram parte dessa etapa da minha vida: Tharcilla (“uma figura”), Ana (sempre prestativa), Bianca Cintra (um exemplo), Bianca Maciel, Carol, Cleidianne, Cris (sempre amiga), Dani, Hellen, Lizzi (alegria do laboratório), Miguel (gentil e divertido), Nanda, Ricardo, Salatiel (cientista), Tércia. Todos vocês contribuíram para que os momentos no laboratório fossem muito agradáveis...

Aos meus colegas de curso, fico feliz por ter feito parte dessa turma especial...

Aos meus amigos, Ane, Antônio, Dayse, Lely, May, obrigada pelo incentivo e por sonharem junto comigo...

Agradeço ao Laboratório de Bioenergia e Meio Ambiente da Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial ao Prof. Ivon e a Prof. Rosenira pelo apoio sempre gentilmente prestado...

Agradeço ao Laboratório de Química e Fertilidade do solo, pelo auxílio no desenvolvimento do meu trabalho, agradeço ao Prof. Eduardo Gross que sempre esteve disposto a colaborar...

Agradeço aos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Genômica, a Gerlab, por terem dado suporte para a realização desse trabalho...

Agradeço a Fapesb e ao Cnpq pelo apoio financeiro, pela bolsa concedida durante todo o curso de Pós-Graduação(Cnpq)...

As palavras aqui expressas jamais conseguirão refletir a gratidão que sinto por todos vocês que contribuíram para a concretização desse projeto.

A todos os que me ajudaram direta ou indiretamente, sou grata...

*“Seja qual for a direção que escolhermos, se pudermos
perceber que cada obstáculo que transportamos nos
prepara e fortalece para o próximo, já estaremos a
caminho do sucesso”*

Bem Carson

RESUMO

O biodiesel tem se destacado como fonte de energia alternativa, além de ser produzido a partir de fontes renováveis, este biocombustível apresenta outras vantagens como a diminuição na emissão de monóxido de carbono e ausência de enxofre e compostos aromáticos na sua composição, reduzindo assim a liberação desses compostos na atmosfera. O biodiesel é um éster metil ou etil de ácidos graxos produzido pelo processo de transesterificação. Pode ser utilizado puro ou misturado ao diesel. No entanto, é freqüente a ocorrência de acidentes que ocasiona o derramamento de combustíveis em ambientes aquáticos e terrestres, esses acidentes podem ocorrer durante o transporte dos combustíveis, ou por vazamentos nas usinas ou nos postos de distribuição. A biorremediação é uma estratégia bastante promissora para tratar de ambientes contaminados. Esse processo consiste na ação dos microrganismos sobre o contaminante, reduzindo-o a dióxido de carbono e água, ou a compostos menos tóxicos ao ambiente. O biodiesel apresenta uma configuração vantajosa no que se diz respeito a sua biodegradabilidade. Neste trabalho foi avaliado o processo da biodegradação e o efeito toxicológico deste combustível na comunidade microbiana do solo. Foram usados sistemas de microcosmos, nos quais os solos foram contaminados com biodiesel em suas diferentes concentrações e diesel. Foi possível constatar que o biodiesel é menos persistente que o diesel. Nas amostras de solos contaminadas com biodiesel foi liberada uma quantidade de CO₂ maior que nas amostras contaminadas com diesel. O biodiesel nas concentrações B20, B50 e B100 apresentaram maior biodegradabilidade, confirmando o que outros autores haviam relatado. Foi constatado que nas misturas biodiesel/diesel, quanto maior a concentração do biodiesel mais biodegradável será o composto.

Palavras-chave: Biodiesel, biocombustível, biorremediação, biodegradação.

ABSTRACT

Biodiesel has emerged as an alternative energy source, and is produced from renewable sources, this biofuel has other advantages as reducing the emission of carbon monoxide and no sulfur and aromatics in their composition, thus reducing the release these compounds in the atmosphere. Biodiesel is a methyl or ethyl ester of fatty acids produced by the transesterification process. Can be used pure or blended with diesel. However, there is frequent occurrence of accidents that cause the fuel spill in aquatic and terrestrial environments, these accidents may occur during the transport of fuel leaks or power plants or gas stations. Bioremediation is a promising strategy for dealing with contaminated environments. This process is the action of microorganisms on the contaminant, reducing it to carbon dioxide and water, or less toxic compounds to the environment. Biodiesel has a configuration is advantageous in regard to their biodegradability. This study evaluated the process of biodegradation and the toxic effects of this fuel in the soil microbial community. Systems are used microcosms, where the soils were contaminated with biodiesel in their different concentrations and diesel. It was found that biodiesel is less persistent than diesel. The samples of soil contaminated with diesel has released a larger amount of CO₂ that the samples contaminated with diesel. Biodiesel B50 concentrations and B100 showed higher biodegradability, confirming what other authors had reported. It was found that in blends biodiesel / diesel, the higher the concentration of biodiesel is more biodegradable compound.

Keywords: Biodiesel, biofuels, bioremediation, biodegradation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1.2 Biodiesel.....	5
1.1.3 Comunidade microbiana.....	8
CAPÍTULO I: Biodiesel biodegradability in microcosms experiments with a tropical range forest soil from South Bahia- Brazil.....	15
Summary.....	16
Introduction.....	17
Material and Methods	18
Soil sampling	18
Evaluation of respiration (CO ₂ production) in microcosms systems.....	19
Effect of biodiesel on heterotrophic cultivable microorganisms.....	19
Growth of microorganisms in biodiesel as sole carbon source.....	20
Microbial biomass.....	20
GC analysis	21
DNA extraction.....	21
DGGE analysis.....	22
Results and discussion.....	23
References.....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO GERAL

Devido a possível escassez de petróleo, a busca por fontes alternativas de energia tem sido uma das maiores necessidades atuais. O biodiesel é uma alternativa bastante promissora por se tratar de um combustível produzido a partir de fontes renováveis. Além de ser uma fonte de energia alternativa, o uso do biodiesel é ambientalmente mais benéfico que os combustíveis de origem fóssil.

A emissão de gases como CO_2 , CO e SO_x é menor com o uso do biocombustível, contribuindo menos com a poluição atmosférica e com o aquecimento global. O biodiesel apresenta uma estrutura menos complexa que o diesel proveniente do petróleo, e segundo alguns autores essa característica influencia na biodegradabilidade do biocombustível. Assim como ocorre com o óleo diesel, a comercialização do biodiesel pode provocar acidentes ambientais, como vazamentos em ambientes terrestres e aquáticos devido ao processo de produção ou transporte do combustível. Apesar de o biodiesel ser considerado um composto biodegradável, ele é um xenobiótico, e pouco se sabe do efeito que o biodiesel pode provocar no ambiente contaminado.

Mesmo apresentando vantagens sobre o óleo diesel, a permanência do biodiesel no ecossistema aquático ou terrestre não é desejável, sendo então necessário o tratamento das áreas contaminadas. Esse tratamento pode ser feito pelo processo da biorremediação, cuja técnica é baseada na ação dos microrganismos, que agem transformando o contaminante em uma substância menos nociva ao ambiente afetado.

Os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação de poluentes e xenobióticos. No entanto, apesar da grande capacidade de degradação desses organismos, compostos como biodiesel pode atuar como fatores estressantes, inibindo os microrganismos e seus processos. Para que o processo da biorremediação ocorra de forma eficaz, é necessário não apenas avaliar a biodegradabilidade de um determinado poluente, mas também estudar o seu efeito sobre o ecossistema atingido.

Poucos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito do biodiesel sobre os microrganismos do solo. Os principais trabalhos que estudaram a biodegradação do biodiesel são relacionados aos sistemas aquáticos. Ainda existe uma grande necessidade em compreender o efeito do biodiesel na comunidade microbiana do solo.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente a grande ocorrência de problemas ambientais em função da intensificação da atividade industrial, tem mudado em caráter e em escala de acordo com a fonte de poluição. As questões ambientais estão cada vez mais ganhando destaque, visto que os recursos naturais estão se tornando cada vez mais escassos. Além disso, o desenvolvimento acelerado tem gerado problemas constantes de poluição que sempre foram ignorados. Vazamentos provenientes de tanques de armazenamentos de combustível, ou ocorridos durante o transporte representam um risco potencial para a sociedade (Lahvis *et al.* 1999). Diante deste problema a introdução de novos combustíveis alternativos deve ser criteriosamente monitorada, os tipos de combustíveis devem ser avaliados quanto a sua composição e seus efeitos sob as áreas impactadas. Avaliar matrizes ambientais e os diversos tipos de contaminantes, monitorar processos naturais de recuperação e propor alternativas para remediação de áreas impactadas, tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos (Maciel *et al.* 2007).

O solo é um recurso natural vital para o funcionamento do ecossistema terrestre, e apresenta funções importantes para o meio ambiente. É responsável por prover um meio para o crescimento vegetal e habitat para animais e microrganismos, pela regulação do fluxo de água no ambiente e serve como um “tampão ambiental” na atenuação e degradação de compostos químicos (Doran *et al.* 1994, Larson e Pierce, 1994) .O solo é um ambiente constantemente afetado por contaminações originadas de atividades antropogênicas. Neste caso a poluição do solo pode ser definida como um acúmulo de materiais que causam danos aos organismos vivos e distúrbios nos ciclos biogeoquímicos (Eitmanaviciute 1995).

Historicamente o solo tem sido alvo de contaminações por combustíveis de origem fóssil (Burger 1993, Burns *et al.* 1993). Entre a grande diversidade de produtos petroquímicos, alguns são resistentes a biodegradação. Essa natureza recalcitrante que combustíveis da indústria petroquímica podem apresentar é bastante preocupante uma vez que são variáveis e dependentes da concentração, tamanho e estrutura da molécula (Chosson *et al.* 1991). A utilização de alcanos na faixa de C₅ a C₉ são tóxicos a muitos microrganismos, devido ao seu efeito solvente, pois tendem a romper a estrutura lipídica da membrana dos microrganismos (Seabra 2001). O aumento e a ramificação da cadeia dificulta a utilização dos alcanos como fonte de carbono, reduzindo a taxa de biodegradação (Rosato 1997). Ambientalmente a diminuição de parte destes compostos pode ser um grande ganho. A utilização de biodiesel tem sido avaliada e utilizada em vários países. Alguns autores ainda afirmam sua capacidade biodisponível (Birchal *et al.* 1995). No entanto muito pouco se sabe sobre o efeito do biocombustível no ambiente.

As estratégias de tratamento a serem implementadas nas áreas contaminadas, devem ser realizadas levando-se em consideração a quantidade e composição do contaminante e as características físico-químicas do solo. Algumas refinarias de petróleo por exemplo utilizam sistemas de tratamento em solo denominados de landfarm e biopilhas, ambas técnicas de biorremediação *in situ* que utilizam a aeração e enriquecimento para estimular e explorar a microbiota indígena (Maciel *et al.* 2007, Ausma *et al.* 2003, Ron e Rosenberg 2002, Seabra 2001). Nestes tratamentos são vistos dois aspectos, a biodegradabilidade e a biorremediação. Ambos os aspectos são intimamente relacionados uma vez que o contaminante tem de ser suscetível a decomposição e degradação por microrganismos. A biorremediação promove um tratamento adequado ao meio, seu custo é relativamente baixo quando comparado à outras alternativas convencionais de tratamento de resíduos (Margesin e Schinner 2001). Nesse

processo os poluentes podem se tornar menos tóxicos a área contaminada, sendo que o benefício máximo que pode ser alcançado com a biorremediação é a mineralização completa dos compostos, assim como a formação de biomassa (Prince *et al.* 1993, Cunha e Leite 2000, Langwaltdt e Puhakka, 2000).

O tipo de solo influencia a biodegradação em fatores determinantes como: a população microbiana indígena, quantidade de matéria orgânica, a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, pH, temperatura, quantidade e biodisponibilidade do contaminante, dentre outros (Hatifield and Stewart 1994, Lapinskiene *et al.* 2006, Margesin *et al.* 2000).

O estudo de impacto ambiental, ecotoxicidade e biodegradabilidade de compostos em solo ou outros ambientes, utiliza também um protocolo normatizado que permite avaliar a capacidade da microbiota em degradar, detoxificar ou mineralizar compostos tóxicos. Este protocolo permite determinar a biodegradabilidade de uma substância em relação a quantidade de CO₂ derivado de metabolismo (EPA 560/6 - 82 - 003). O uso experimental de frascos para medirem a respiração de ambientes contaminados ou a ecotoxicidade de um dado composto é mundialmente conhecido e estabelecido.

1.1.2 Biodiesel

O governo Brasileiro tem incentivado e pressionado a utilização de biodiesel em substituição ao diesel levando em consideração a riqueza de plantas oleaginosas no país e a possível escassez de petróleo. Em 2005 foi publicada a Lei 11.097, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Estabelecendo a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional. Esse percentual obrigatório será de 5% oito anos

após a publicação da referida lei, havendo um percentual obrigatório intermediário de 2% três anos após a publicação da mesma (<http://www.biodiesel.gov.br/>).

O Biodiesel é composto de éster metil ou etil de ácidos graxos de baixa complexidade estrutural como oleato, palmitato, estearato, linoleato, miristato, laureato e linolenato (Tabela 1), derivados de uma diversidade de oleaginosas tais como, soja, dendê, mamona, canola, girassol e de gordura animal (Pinto *et al.* 2005, Mariano *et al.* 2008). Diferente do biodiesel, o óleo diesel contém 2000 a 4000 hidrocarbonetos, uma complexa mistura de alcanos e compostos aromáticos obtidos do processo de separação do petróleo (Gallego *et al.* 2001, Mariano *et al.* 2008).

Tabela 1- Composição média de Ácidos Graxos dos ésteres etílicos obtidos do óleo de soja.

N° de carbonos	Ácido Graxo	Concentração (%)
C16:0	palmítico	11,29
C18:0	esteárico	3,54
C18:1	oléico	22,45
C18:2	linoléico	54,62
C18:3	linolênico	8,11

Fonte: Ferrari *et al.* (2004)

A transesterificação é o processo mais utilizado para produzir biodiesel. Consiste numa reação química do triglicerídeo com o álcool metílico ou etílico, estimulada por um catalisador, produzindo um éster de ácidos graxos e glicerina (Figura 1). O biodiesel pode ser usado puro (B100- 100 % de biodiesel), ou misturado ao diesel em diversas misturas. As misturas podem variar de 2 % a 50% de biodiesel, e são nomeadas pela percentagem de

biodiesel com o prefixo B (B2- 2% de biodiesel e 98% de diesel; B50- 50% de biodiesel e 50% de diesel) (Prince *et al.* 2008).

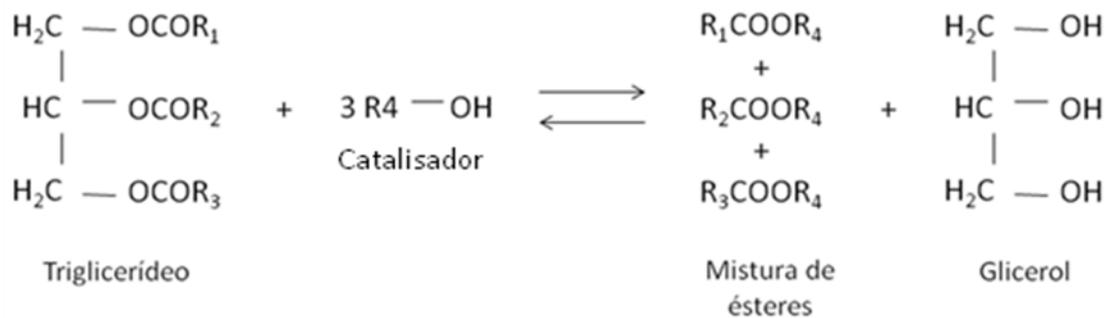


Figura 1. Reação de transesterificação de um triglicerídeo para produção de biodiesel.

De acordo com a literatura dos benefícios ambientais relacionados com a combustão do biocombustível (menor emissão de CO_2 , CO , SO_x , compostos orgânicos voláteis e material particulado), a diferença entre a composição do diesel e biodiesel também influencia sua biodegradabilidade (Pinto *et al.* 2005, Mariano *et al.* 2008).

O biodiesel apresenta uma configuração vantajosa no que se diz respeito a sua biodegradabilidade. Sua estrutura molecular é susceptível ao ataque microbiano que utilizará o biodiesel como substrato para crescimento. Desta forma, maquinarias enzimáticas quebram o biodiesel em outros produtos, que também precisam ser estudados para que não gerem efeitos tóxicos indesejáveis (Mudge e Pereira 1999). Relatos demonstram que o biodiesel é facilmente degradado por microrganismos que degradam óleos e gorduras, como o diesel. De acordo com Birchall *et al.* (1995) o biodiesel é menos tóxico que os derivados de petróleo que

possuem geralmente em sua composição compostos recalcitrantes e de difícil degradação. O biodiesel é menos persistente que os outros combustíveis, ou seja, é mais biodegradável que os demais, o que é bastante vantajoso em relação ao meio ambiente. Entretanto para prevenir uma contaminação indesejável é necessário vários estudos a cerca de sua toxicidade. Finch *et al.* (2002) por exemplo, demonstraram pequenos efeitos tóxicos em pulmões de ratos expostos a emissões de óleos combustíveis derivados do óleo de soja em alta concentração.

Um dado bastante interessante é descrito por Miller e Mudge (1997) que observaram que o biodiesel age como solvente não volátil que dissolve óleo bruto. Na maior parte das contaminações costeiras, a maioria dos compostos voláteis evapora e os menos voláteis como os PHAs (hidrocarbonetos poli aromáticos) persistem e constituem uma mistura complexa de contaminantes. O biodiesel é capaz de dissolver esses componentes e torná-los disponíveis ao ataque microbiano. Além disso, apenas a título de comparação entre biodiesel e combustível fóssil bruto em um estudo de biodegradabilidade 10.000 ppms de cada um é degradado em 28 dias 81% e 54% respectivamente. Se a concentração sobe para 100.000 ppms a porcentagem de degradação seria de 50 e 16% respectivamente. No solo combustíveis tipo biodiesel são rapidamente degradados (<http://.cti2000.it/biodiesel/biodegradabilit% E0.htm>).

1.1.3 Comunidade microbiana

Diversa e numerosa a comunidade microbiana representam cerca de 60% a 80% da fração viva e mais ativa da matéria orgânica do solo. É responsável pela manutenção da qualidade do solo, decomposição de resíduos de origem animal e vegetal, ciclagem biogeoquímica, formação e manutenção da estrutura do solo, decomposição de agroquímicos e poluentes que são depositados no solo. Qualquer alteração no desenvolvimento normal de

um ou outro grupo de microrganismos pode influenciar significativamente os processos microbiológicos ocorridos no solo (Lapinskiene *et al.* 2006). Apresentam uma alta sensibilidade a baixas concentrações de poluentes, e possuem uma capacidade de responder de maneira rápida às perturbações causadas no solo.

A atividade metabólica sobre um composto pode ser medida em relação a quantidade de CO₂ derivado de mineralização. A medida da evolução de CO₂ mede indiretamente a degradação de um substrato (Lyman *et al.* 1990). É uma técnica relativamente simples, econômica e não promove ação poluente já que não utiliza a mineralização ou quebra da matéria orgânica no solo com solventes orgânicos. Em condições aeróbicas e com fornecimento de nutrientes (N, P), os microrganismos conseguem metabolizar substâncias como hidrocarbonetos em CO₂ e água como produtos finais. O CO₂ é indicador de degradação da substância orgânica. Se o substrato é a única fonte de carbono, a quantidade de CO₂ produzida será proporcional à quantidade de carbono do substrato teste consumido pelos microorganismos (Zhang *et al.* 1998).

Para estudos de biodegradabilidade e avaliação do efeito do biodiesel em suas concentrações comerciais, acredita-se que controles de emissão de CO₂ não sejam suficientes. A avaliação sobre a microbiota local e o efeito causado nela são de extrema importância uma vez que se tratam dos principais degradadores de matéria orgânica na natureza. Os resultados não podem ser tomados como universais uma vez que o ambiente contaminado tem características diferentes que devem influenciar diretamente na comunidade microbiana (Maciel 2004).

Uma variedade de ensaios para o estudo da estrutura da comunidade microbiana tem sido bem documentado através das análises de ácidos graxos metil-éster (Bobbie & White,

1980), ácido graxos fosfolípidios (Rajendran *et al.* 1992) e perfil da respiração. Métodos baseados na atividade enzimática, os quais são ensaiados diretamente em efluentes e amostras de solos, podem ser usualmente utilizado como indicador da biomassa microbiana (Boczar *et al.* 1992, Nybroe *et al.* 1992). Outro fator relevante se encontra no fato de que a biomassa é um indicador da expressão microbiana no solo, pois é uma das poucas frações de matéria orgânica biologicamente significativa, sensível ao manejo ou poluição e finalmente mensurável (Powlson 1994, Fritze *et al.* 1996).

Devido à necessidade de avaliar os efeitos dos eventos de derrame sobre a qualidade do solo (Brohon *et al.* 2001), houve interesse crescente no desenvolvimento de bioindicadores facilmente medidos, que são sensíveis à perturbação bem como relacionados com as funções do solo (Joergensen *et al.* 1995). A extensão do dano depende da vulnerabilidade intrínseca de um solo à contaminação e à sua capacidade de recuperação (resiliência). Resiliência do solo é definida como a capacidade de um ecossistema de solo retornar ao equilíbrio dinâmico após uma perturbação (Blum 1997).

A biomassa microbiana do solo é um dos melhores parâmetros para ser testado para essa finalidade (Jenkinson e Ladd 1981, Chander e Brookes 1991). Ela representa a massa de todos os microrganismos do solo, considerado como única fração de matéria orgânica do solo (Jenkinson 1976). A biomassa é responsável pela decomposição da matéria orgânica em ecossistemas terrestres e, portanto, em última instância responsável pela manutenção da fertilidade do solo. A biomassa microbiana do solo responde prontamente a perturbação do solo e pode fornecer um alerta eficaz precoce da deterioração da qualidade do solo (Zak *et al.* 1994, Powlson 1993). No entanto, dados não experimentais de campo sobre o tamanho das respostas da biomassa microbiana são geralmente difícil de interpretar devido à falta de controles adequados.

A biomassa microbiana é também um agente de biodegradação, o principal mecanismo pelo qual a matéria orgânica é decomposta e poluentes orgânicos são removidos do solo (Marschner e Kalbitz 2003, Fan e Scow 1993). Compostos não solúveis são, em regra, muito mais resistentes, mas também são degradados por microorganismos do solo a longo prazo. Além de serem disponíveis para os microorganismos, compostos não solúveis são também fortemente adsorvido em colóides do solo como minerais de argila e substâncias húmicas. Isso os torna ainda menos acessível a degradação por microorganismos (Field *et al.* 1992). O impacto real da fração sorvida na atividade biológica do solo é difícil de avaliar (Ruggiero *et al.* 2001), enquanto a sorção diminui a toxicidade a curto prazo, também permite maior persistência das substâncias nocivas. Estes aspectos ainda não são totalmente compreendidos.

Produtos petrolíferos, uma vez inseridos no ambiente, alteram as condições gerais dos sistemas biológicos em função da sua concentração. O pH e a aeração do meio são alterados, e os organismos são diretamente influenciados. Sabe-se que pequenas quantidades de óleo estimula o crescimento de microorganismos, visto que os hidrocarbonetos podem ser usados como fonte de nutrientes. Em níveis mais elevados de poluição, o número de microorganismos diminui, a sua composição relativa é alterada e os indicadores quantitativos dos processos microbiológicos, tais como atividade enzimática, também mudam. É importante conhecer a ação dos contaminantes sobre a microbiota do solo, e se esses materiais estão causando efeito tóxico sobre os microorganismos do solo (Lapinskiene *et al.* 2006) .

Estudos da influência de produtos derivados do petróleo sobre a população de minhocas já foram concluídos (Baltrenas *et al.* 1999). Mas a influência de um diesel ou biodiesel sobre microorganismos do solo, que tendem a ser mais sensíveis à poluição e que participam do processo de biorremediação, ainda não foi determinada.

O estudo da microbiota presente em áreas contaminadas, através das técnicas tradicionais de cultivo, permite o isolamento e contagem de microrganismos e comparação entre outros níveis de contaminação ou entre misturas. No entanto apenas uma pequena fração pode ser isolada, uma vez que meios de cultura para contagem de heterotróficos totais ou seletivos não são capazes de mimetizar as condições ambientais em que os microrganismos estão adaptados. O mesmo pode acontecer entre estudos de impacto sobre a comunidade microbiana de modo que técnicas moleculares podem ajudar e fornecer números mais informativos de comunidades específicas as quais se tem o interesse de avaliação.

A extração de DNA microbiano total é atualmente uma necessidade. A depender do solo a concentração e o tipo de matéria orgânica no solo podem ser determinantes na escolha do método. Maciel e colaboradores (2009) relataram o uso de um método baseado em lise mecânica e extração por Fenol, clorofórmio, álcool isoamílico para extração de DNA de solo com borras oleosas. Outros métodos são indicados em ambientes contendo óleo. No entanto não podem ser considerados universais (Maciel *et al.* 2009).

A amplificação de regiões conservadas do DNA ribossomal, gel de eletroforese com gradiente de desnaturação (DGGE) e análises de restrição do DNA ribossomal marcado terminalmente (TRFLP) tem permitido um estudo associado da estabilidade filogenética da microbiota, sem possuir culturas isoladas dos microrganismos (Nubel *et al.* 1999, Mayzer e Smalla 1998, Teske *et al.* 1996).

Estas técnicas foram introduzidas no campo da ecologia microbiana molecular, aliada à extração direta de DNA da comunidade, demonstrando seu valor no estudar da dinâmica de

populações específicas em função de variações ambientais. (Muyzer *et al* 1993, Tesket *et al.* 1996, Brinkhoff e Muyzer 1997, Heuer *et al.* 1997).

O DGGE foi originalmente desenvolvido para identificar e localizar mutações de ponto, naturais e induzidas. É uma técnica baseada na eletroforese dos fragmentos de DNA, previamente amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (uréia e formamida) de DNA . Para o estudo da diversidade microbiana, o gene para o rRNA tem sido freqüentemente utilizado (Muyzer *et al.* 1993); entretanto, outros genes preservados podem ser igualmente analisados por DGGE (Maciel 2004).

Durante a corrida eletroforética, pequenas regiões denominadas domínios de desnaturação sofrem dissociação das fitas dupla-hélice de DNA, gerando moléculas parcialmente desnaturadas com mobilidade eletroforética retardada. Quando o último domínio (o mais estável) sofre desnaturação, o fragmento tem suas fitas complementares totalmente dissociadas e o poder de resolução do gel é perdido. Contudo, uma seqüência rica em guanina (G) e citosina (C), cerca de 40 bases, é acoplada a extremidade 5' do *primer forward*. Assim o fragmento do rDNA amplificado desnatura como um domínio único durante a corrida eletroforética e esta seqüência rica em GC permanece em configuração duplex, impedindo a completa separação das duas fitas da molécula de DNA. As variações na composição de bases dentro destes domínios alteram o comportamento da desnaturação e, conseqüentemente, o padrão eletroforético no gel desnaturante apresenta-se diferente para cada microrganismo (Maciel 2004).

Na Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus, Bahia, Brasil existe uma planta para a produção de biodiesel. O grupo de Bioenergia produz uma série de biocombustíveis,

participando de vários projetos governamentais. Recursos oriundos de órgãos de fomento têm patrocinado pesquisas em emissões de gases e biodegradabilidade. Uma vez que a planta esta localizada no ecossistema de Mata Atlântica, foi realizado um trabalho no qual microcosmos do solo da região foram contaminados com diesel, B100, B5, B20 e B50 separadamente. A partir destes microcosmos foram avaliados a evolução do CO₂, a degradação dos compostos por cromatografia gasosa, a contagem de heterotróficos totais e a avaliação sobre impacto de comunidade microbiana distinta.

CAPÍTULO I

Biodiesel biodegradability in microcosms experiments with a tropical range forest soil from South Bahia- Brazil

SILVA G. S., DIAS, J.C.T., GROSS, E., CASCARDO, J.C.M., REZENDE, R.P. *

Dept. Ciências Biológicas, UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. BR 415, Km 16,
Ilhéus-BA, 45650-000, BRAZIL.

Running title:

"Biodegradability of biodiesel"

** Correspondence and proofs should be addressed to:*

Dr^a. Rachel Passos Rezende
Dept. Ciências Biológicas
UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz
Rod. Ilhéus-Itabuna, Km 16
Ilhéus-BA, 45650-000, Brazil

phone: 011 55 73 680 5033

fax: 011 55 73 680 5226

e-mail: rachel@uesc.br

Summary

Despite the persistence of some toxic chemicals in the environment that can contaminate freshwater and soil the persistence of man made compounds is not desirable. Studies about the biodegradability of biodiesel in soil are of considerable public concern. The objective of this work was establish if soy biodiesel produced by Laboratory of Bioenergia and Meio Ambiente at Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilheus, Bahia, Brazil) is biodegradable comparing with diesel fuel through microcosms experiments with soil from tropical range forest. It was verified respiration, by CO₂ production, in all experiments with highest production in soil contaminated with B50 and B100 blends. Microbial counts were established in media for total heterotrophic. The CFU from soil contaminated with B100 and the blends B5, B20 e B50 was higher than the control soil. In order to find natural degrading microorganisms biodiesel was used as the sole carbon source, but none growth was observed, what indicates that microbial cultivable community needs a previous adaptation. Nutrients addition did not alter the microbial counts in media containing biodiesel. In according to chromatographic analyses the microcosms contaminated with diesel fuel and b5 blend seems to be more resistant to biodegradation than B20, B50 and B100. This study reports simple protocols to access the biodegradability of biodiesel. Some difficulties observed concerns to not prompt biodegradability of biodiesel in soils that seems to demand of indigenous microbial adaptation.

Introduction

Biodiesel developed from vegetable oils are promising as alternative fuel and due to depletion of petroleum it becomes attracting large attention in the fuel market. Biodiesel has some advantages in relation to diesel because it is a removable energy source and diminish the environmental pollution caused by SO₂, soot and halogens. They are sulfur free and engine fueled emit fewer particulates, hydrocarbons, less CO than those operate by diesel fuel (Kaieda *et al.* 1999, Nouredine *et al.* 2005, Birchall *et al.* 1995). The biodiesel presents an advantageous configuration in respect to its biodegradability because no recalcitrant or difficult degradation compounds are present what is quite advantageous in relation to the environment (Mudge and Pereira 1999).

Some man made products can not cause apparently environmental impacts, moreover the impacts can be assessed in different degrees in water and soil which are the most important issues for living systems. And despite of the introduction of man-made compounds and pollution caused by accidents of oil spilling that contribute substantially to environment pollution causing acute and chronic adverse impact (Burger *et al.* 2000, Burger 1993, Shaw 1992, Burns *et al.* 1993), the persistence of biodiesel is not desirable even it consists of mainly fat acids. Lowrier (1998) and Zhang *et al.* (1998) showed that biodiesel has a fast degradation in the aquatic environment. Particularly the biodegradability studies in the water make mention to the use of established procedure for Environmental Protection Agency (EPA 560/6 - 82 - 003). This protocol allows determine the biodegradability of a substance in relation to amount of CO₂ released. Correspondingly little is known about the effects that biodiesel can cause on soil which is of fundamental importance in an ecosystem behavior, sustain life as physical and biological element, giving support and nutrition condition to develop in

equilibrium. Therefore, is of relevant importance examine the biodegradability of biodiesel fuels in natural soil to prevent undesirable impacts.

In Brazil this type of fuel becomes commercialized blended to diesel and various researches have been done in the search for alternatives to diesel fuel. The group of Bioenergia and Meio ambiente locates at Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, Bahia, Brazil) posses a plant research in biodiesel production. In this work the biodiesel makes by this group was investigated in relation to its biodegradability by indigenous microorganisms in microcosm experiments using range forest soil. The findings showed that studies concerning biodegradability by measuring the production of CO₂, chromatographic analysis of biodiesel components and impact on microbial community in soil contaminated with biodiesel is necessary and simple strategies can be applied.

Material and Methods

Soil sampling

The soil samples were tacked from fields without a reported history of biodiesel or diesel exposition. The soil was collected next to experimental station for Biodiesel production of Lab. Bioenergia and Meio Ambiente at Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus - Bahia, Brazil and classified as a sandy clay soil. Soil samples were collected from the surface layer of the soil up to a depth of 10 cm. The analytical, total fertility plus organic mater were performed by Lab. of Solos e Nutrição de Plantas of EMBRAPA (see table 1). This soil was used in Microcosms experiments in order to determine in situ biodegradation potential, microbial counts, and to detect natural cultivable microorganisms associated to biodiesel degradation.

Evaluation of respiration (CO₂ production) in microcosms systems:

A solution of each commercial concentration of biodiesel (B5, B20, B50, B100) and diesel (D100) sufficient to give a final concentration of 5% was added to 100 g sub-samples of soil, which were then incubated in Biometer (Figure 1) flasks for 60 days at 28° C. Respiration was evaluated by the carbon dioxide production method using the procedure described by Bartha and Pramer (1965) with modifications. For determination of the CO₂ production, solutions of sodium hydroxide 0.1 M were introduced in the flasks and every 5 days for a period of 60 days after biodiesel application, this solution was collected and the production of CO₂ was measured, through titration with HCL 0.1 N. One drop of phenolphthalein was used as pH indicator. The mean respiration of the blanks were subtracted from the treated microcosms and the difference in CO₂ production between the blanks and the treated microcosms were used as the amount CO₂ produced. The controls were accomplished with soil autoclaved and soil without biodiesel.

Effect of biodiesel on heterotrophic cultivable microorganisms

Aliquots of 1g of soil were retired from microcosms (disturbed soil and undisturbed soil) in periods 0, 30 and 60 days of incubation. A 10-fold dilution for each aliquot of soil (B5, B20, B50, B100, D100 disturbed and undisturbed soil) was performed using sterile saline solution (NaCl 0.85% w/v). One mL of each dilution was poured onto Petri-dishes containing PCA medium to count the total cultivable viable microorganism. Estimation of the microbial populations (CFU.mL⁻¹) was determined after incubation at 30° C for 24-48h.

Growth of microorganisms in biodiesel as sole carbon source

In order to verify the occurrence of natural degrader microorganisms, able to growth in biodiesel as the sole carbon source a minimal medium (2% w/v agar, 0.1% w/v KH_2PO_4 , 0.1% w/v K_2HPO_4 , 0.1% w/v NH_4NO_3 , 0.05% w/v MgSO_4 , biodiesel B20 2%, pH 7.0) was used (Degradation media - DM). A so called rich degradation medium (RDM) using YNB (DIFCO) was used with the propose to verify if its improve the microbial use of biodiesel. After autoclaving for 25 min and cooling at 50°C, 2% v/v of biodiesel (B20) was added into the DM and DRM medium under shaking before solidification. A 10-fold dilution for a sample of undisturbed soil was performed using sterile saline solution (NaCl 0.85% w/v). One mL of each dilution was plated in DM and RDM. Estimation of the microbial populations ($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) was determined after incubation at 30°C for 48-72h.

Microbial biomass

The determination of microbial biomass was carried out using the fumigation-extraction in according to Vance *et al.* (1987). The determination of carbon was made at 0 and 60 days. From each system were removed 20 g of soil fumigation and 20 g for direct analysis, the samples were then placed in glass flasks. In samples for fumigation, it was added 1 ml of chloroform. The flasks were then sealed and stored free from light for 24 hours. After this period, the vials were kept open in laminar flow hood to evaporate all the chloroform. Then the extraction was done in samples sprayed in non-fumigated samples, extraction was performed immediately after weighing by adding 50 ml of K_2SO_4 (0.5 M) in soil samples. Each flask was shaken for 30 minutes in a rotary Shaker, then the soil was decanted and the supernatant was recovered after filtration in 45 mm membrane. 8 ml of filtered was

transferred to another flask and a solution 2 ml of potassium dichromate (0.066 M), 10 ml of sulfuric acid, 5 ml of ortho-phosphoric acid in 70 ml of deionized water were added. Determination of microbial carbon contained in the samples was done by titration with ammonium ferrous sulfate (0.033 M). After the titrations were made calculations of carbon content in the extract and calculation of the BMS-C.

GC analysis

Samples were taken from soil microcosms systems contaminated with B5, B20, B50, B100 and D100 at 0, 30 and 60 days. Hexane was used to make extraction of compounds in diesel and biodiesel. The supernatant was removed from each sample and then subjected to a rotavap to evaporate all the solvent, leaving only the extract. Then from extract fraction it was collected 5 mL that was diluted in 500 mL of hexane. The GC analysis was performed on a GC Shimadzu 2010, injector AOC 20i with detector of flame ionization (FID) using an RTX-WAX column (30 m, with 0.25 mm of internal diameter, film 0.25 μm) and hydrogen as carrier gas. The injector temperature was 280 ° C, the temperature of the system interface controls was 280 ° C. 1 ml of injected sample was analyzed with the program of temperature: 80 ° C for 1 min, heating rate: 15 ° C / min to 230 ° C, maintained for 24 min.

DNA extraction

DNA extraction from soil of microcosms were made in according to Maciel *et al.* (2009). Where samples were first washed three times with 3 mL TE buffer 50/50 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0). Lysis was performed by mechanical lysis in liquid nitrogen. The soil was then transferred to a 10.0-mL plastic tube to which 2 mL TE buffer 50/50 and an equivalent volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) were added, and the

mixture was gently vortexed for 1 min. The mixture was centrifuged at 2700 rpm at 4°C for 10 min and the supernatant collected. To precipitate DNA, 0.7 vol. cooled isopropanol and 1/10 vol. 3 M sodium acetate were added to the supernatant. The mixture was gently mixed (5-10 times) and kept at -20°C overnight. The sample was centrifuged at 2700 rpm for 10 min, and the pellet was washed three times with cold 70% ethanol and then resuspended in 100 µL TE buffer 10/0.1 (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). After the washing step, the extracted DNA was then purified in mini-columns of SEPHADEX G-200 (Pharmacia, Sweden).

DGGE analysis

Três conjuntos de primers foram utilizados para amplificar regiões específicas do gene 16S e do gene 26S rRNA. Uma região de aproximadamente 360 pb do gene 16S rRNA foi amplificado usando os primers F984 (5'-GCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGG
GGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGG CCCGGGAACG-3') (Heuer et al. 1997). A seqüência em F984 sublinhado indica o grampo GC necessário para a análise de DGGE (Sheffield et al. 1989). Um fragmento da região D1 do gene 26S rRNA foi amplificado usando primers universais para eucariontes, NL1GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3 ') e LS2 (5'-ATT CCC AAA GAC CTC CAA TC-3 '). E um fragmento da região V3 do gene 16S rRNA foi amplificado usando os primers F385 gc-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG e R518 ATTACCGCGGCTGCTGG. Todas as reações de PCR realizadas durante o trabalho utilizou um mix com 1,25 U de *Taq* polimerase, 5 µL de tampão da reação 10x, 200 µL de deoxinucleotídeo, 3,0 mm de MgCl₂, 1 µL de DNA e água Milli-Q estéril, em um volume final de 50 µL. As seqüências de rDNA amplificadas foram analisadas em um gel de poliacrilamida a 8% (w/v) (37.5:1 acrilamida: bis-acrilamida),

constituído por um gradiente de desnaturação de 40-70%. Os géis foram corridos em tampão TAE 0.5X (20 mM Tris acetato, pH 7,4, acetato de sódio 10 mM, 0,5 mM EDTA dissódico) a uma voltagem constante de 60 V por 18 h a 60 °C (procarioto), e 200V por 4 h a 60°C (levedura). As bandas foram visualizadas pela coloração com nitrato de prata. Cada banda foi considerada uma unidade taxonômica operacional (OTU).

Results and discussion

During the past few decades the incidence and threat of oil pollution has resulted in extensive research with several studies conducted on microbial petroleum hydrocarbon biodegradation (Atlas 1981, Bertrand *et al.* 1983, Smith 1990). However, few data exist about degradability of the alternative biodiesel. Although biodiesel have so many advantages as its fast degradation in the aquatic environment (Lowrier 1998, Zhang *et al.* 1998) in the soil it needs more investigations to avoid possible drawbacks.

In order to verify biodegradability, biodiesel effect on microbial community in microcosms and naturally occurring microorganisms able to use biodiesel as the sole carbon source, a soil sample (see table 1) was obtained next to Biocombustível plant area, located at the tropical Northeast Region of Brazil, and processed for those studies. The soy biodiesel used in this study was obtained from Bioenergia and Meio Ambiente Lab. that produces biodiesel by transesterification process (Fukuda *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2003, Kusdiana and Saka 2004, Warabi *et al.* 2004).

In the lack of nutrient addition or interference, the experiment were performed to access the respiration by CO₂ production, microbial biomass, cromatografic and microbial analyses by contaminating the soil with the blends B5, B20, B50, and B100, D100 fuels. A

positive control was prepared with soil without contamination (Figure 2). It was verified CO₂ production what suggests that microbial from soil is able of using biodiesel as energetic source. The controls of CO₂ emissions don't guarantee widespread results, and each result has to be analyzed in agreement with the soil type used in the experiment. If comparing with the control soil (uncontaminated soil) that shows the greater respiration rate in day 15, we can suggest that active microorganisms needs adaptation to the contaminants. Respiration occurs with an increase in the day 15, stabilization after day 25 and a decrease after day 45.

Figure 2a shows CO₂ evolution from soil contaminated with B100, D100 and uncontaminated soil as control, the two samples showed a release rate of CO₂ greater than the control sample, but B100 was the substrate that promoted a major rate. This results suggests that biodiesel is more biodegradable than diesel fuel. Figure 2b compares the samples B5, B20 and B50 with uncontaminated soil, as B100 and D100, the mixtures also showed a respiration rate greater than that of control sample. Between the mixtures, B50 was the most biodegradable. Table 2 shows variation of the initial CO₂ released and the maximum. B50 and B100 showed maximum values of 41.47 and 42.35 mg C K⁻¹ respectively. Lapinskiene *et al.* (2006) found that respiration intensity in contaminated soil with biodiesel was greater than in soil with diesel, showing that the level of complete biodegradation (as measured by the amount of CO₂ released) is directly dependent on the microbial activity .

Although the results, with contaminated soil shows a same behavior in respiration, the blends B50 and B100 seen to be less aggressive to soil. In respect to blends, Miller and Mudge, (1997) and Mudge and Pereira (1999) have demonstrate that biodiesel addition on diesel enhance the biodegradation because acts as a non volatile solvent that dissolve crude oil or diesel increasing availability for cell uptake and use as carbon source.

Previous researches describe that biodiesel reduces emissions of total hydrocarbon, CO, particulate materials, smoke density (Knothe *et al.* 1997, Wang *et al.* 2000, Monyem and Van Gerpen 2001) what is quite advantageous. Moreover the microbial modification can lead to negative impacts interfering in the soil recuperation. When compared to the amount of total heterotrophic microorganisms and microbial biomass (Figures 3 and table 3) in contaminated and uncontaminated soil, our results showed that biodiesel favored the growth of microorganisms. In total heterotrophic count at 0 and 30 days, a considerable difference in the amount of heterotrophic is observed. However, these results, when compared to biodiesel and diesel, do not confirm the difference in the effect of these two fuels seen in the analysis of basal respiration. However, it is known that cultivation techniques are not adequate to assess the microbial community, and the impact of biodiesel on the microbial community was evaluated using the DGGE. Maciel *et al.* 2009 showed a method for extracting DNA from soil contaminated with oil and this method was applied to the study of soils contaminated with different mixtures of biodiesel. As we can see, it was noted that he has a large amount of organic matter in soil (Table 1), add to that the fact that the soil has been contaminated with oil.

The analysis by DGGE was not sufficient to infer changes in the community of eubacteria, which may be due to the conditions of the sample. However, the analysis of the yeast community showed a qualitative change in the OTUs, different OTUs were observed after 60 days (Figure 4). DGGE analysis with primers for the V3 region of the 16S rRNA showed a fairly obvious change in the community of organisms in soil contaminated with B5, B20, B50, B100 and D100 after 60 days of incubation (Figure 5 and 6). In soils contaminated with B5, B20 and B50 was an increase in microbial diversity, however, the sample of soil contaminated with B100, there was a decrease in the diversity of microorganisms. Showing that the B100 despite

being highly biodegradable, negatively affects the soil microbial community. It is noteworthy that the soil sample contaminated with B100, 60 days of incubation, showed no amplification with the primer for yeast (Figure 4), indicating that pure biodiesel should also have affected the community of yeasts present in solo. Esses effects of by the addition of pure biodiesel in the soil, can justify the result obtained with the total heterotrophic count from the sample with addition of B100, this sample was observed with a significant reduction of microbial growth after 30 days incubation.

The decrease in microbial diversity with the addition of B100 in the soil, may be related to the presence of byproducts that are formed by the degradation of biodiesel, such products can inhibit microorganisms and their metabolic activities. In soils contaminated with mixtures (B5, B20 and B50), the effect on the microbial community may not occur due to increased availability of substrates present in these mixtures, which can make the microorganisms more adapted to stressful conditions caused by the addition of biofuel in the soil .

It was conducted an experiment in order to verify the nutrient addition support the isolation of natural occurring cultivable microorganisms that can use biodiesel as the sole carbon source. Both Degradation minimum media (DM) and Degradation rich media (RDM) containing biodiesel (B20) as the sole carbon source plated with uncontaminated soil showed no microorganisms. However after adaptation it was possible to observe growth. No difference was achieved between DM and RDM media that contain rich nitrogen source (Figure 7). Controversially some studies on petroleum biodegradation have show that the addition of fertilizers is a common practice for biodegradation of petroleum hydrocarbons (Swannell *et al.* 1996, Walter and Crawford 1997), where the more widely biorremediation procedure is biostimulation by addition of nutrients, such as N and P (Morgan and Watkinson, 1989). Other research with biodiesel show that wastewater from a biodiesel producton plant

addition of urea facilitates degradation (Suehara *et al.* 2005). In our work the addition of rich nitrogen source did not stimulate or inhibit the culture counting what suggests that was not necessary to use rich medium to stimulate the soil indigenous microbiota for biodiesel degradation.

Chromatographic analysis shows the degradation of biodiesel compared to diesel. B100, B5, B20 and B50 were more degraded than the D100 (Figure 8). Even in the blends, biodiesel is more easily and quickly biodegradable, so it blends with the greatest amount of diesel are more resistant to microbial attack. Soon, B5, in spite of this biodiesel is 100% degraded (Figure 9a and 10d), the diesel, which is present in greater quantities, keeps on, but diesel complex composition has to be considered (Lapinskiene *et al.* 2006). The same happens with the blends B20 and B50 (Figure 10c and 10b), however the amount of diesel in these mixtures is lower than in B5. Taking into account the concentration of biodiesel and diesel in each mixture, that one that has a greater amount of biodiesel is more readily biodegradable. The blends B20, B50 and B100 were the most degraded by soil microorganisms.

Soil contaminated with B50 has a correlation between the degradation of biodiesel and diesel. Biodiesel seems to favor the bioavailability of diesel to microorganisms attack (Figure 9b). These results are consistent with literature that reports that biodiesel can promote and accelerate the biodegradability (Mudge and Pereira 1999, Fernandez-Alvarez *et al.* 2006). Some authors reported the effect of biodiesel addition to diesel, indicating that biodiesel affects biodegradation towards cometabolic transformation of hydrocarbons (Zhang *et al.* 1998, Mudge and Pereira 1999, Pasqualino *et al.* 2006). Moreover, DeMello *et al.* (2007) observed that the biodegradation of hydrocarbons has not been accelerated by the presence of biodiesel.

Analyzing the degradation of each ester of biodiesel used for the experiment, we observed that esters with the greatest unsaturation (linoleate and linolenate) were the most degraded in all samples (Figures 10a, 10b, 10c and 10d). The esters palmitate, stearate and oleate, in the presence of a higher concentration of diesel, had a more difficult degradation (Figures 10a and 10b). A large number of unsaturation makes the molecules less chemically unstable, suitable for oxidation, degradation and polymerization. However, little is known of the fact that there is any direct relationship between the unsaturation of the esters and the degradation process. DeMello *et al.* (2007) found that the methyl ester of C16 fatty acid was degraded faster than the methyl esters of C18, and the rate of degradation of the methyl esters of C18 fatty acids did not correspond with the degree of saturation. In contradiction, Miller and Mudge (1997) reports that several esters of C18 unsaturated fatty acids degraded more rapidly than esters of C16.

In this study the rate of biodegradation of both pure diesel and diesel mixed with biodiesel was low and slow as in Penet *et al.* (2006). After 30 days of B100 microcosm contamination the compounds (esters) were almost completely degraded (approximately 90%), in comparison D100 was only 13.6% degradable. In B5 and B20 blends the degradation of diesel has also been slow and low, when compared with that of B50. Blends B5, B20, B50 and D100, with 30 days still had a considerable amount. Comparing and taking with another reports this result suggest that the biodegradation of diesel and biodiesel is more rapid in aquatic systems than in soil, in spite of aquatic environment was not a object of study (Price *et al.* 2008, Davis *et al.* 2003).

It was observed through the overall results of quantitative assessment of the transformation process of the microbial fuel that diesel have materials more resistant to

oxidation, while compounds in biodiesel are more accessible as a source of energy and are better biotransformed.

We concluded that favorable results were presented using mixtures B20, B50 and B100 in relation to its action on the soil microbial community. But bioremediation strategies for the degradation of biodiesel in the soil should be implanted, because microorganisms need time of adaptation.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FABESB) and Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (CNPq). Grants for Gislaine Santos da Silva were provided by Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento (CNPq).



Figure 1: Biometer flask where it was make the microcosms experiment. In the Erlenmeyer like side it was inoculated the soil and biodiesel, the tube like side contain the NaOH solution that will uptake the CO₂ generate during respiration metabolism.

Table 1- Chemical and physical characteristics of soil were made by soil and plant nutrition from Embrapa.

Sample	pH	P	K	Ca	Mg	Ca+Mg	Al	Na	H+Al	S	CTC	V	Organic mater
	In water	mg/dm ³	cmol _c /dm ³									%	g/kg
Soil	6.0	39	0.82	11.8	0.8	12.6	0.1	0.30	4.73	1372	18.45	74	68,82
Granulometry (g/Kg) with NaOH dispersion													
	Sand silt clay		silt		argyle		Textural classification						
	496		232		272		sandy clay soil						

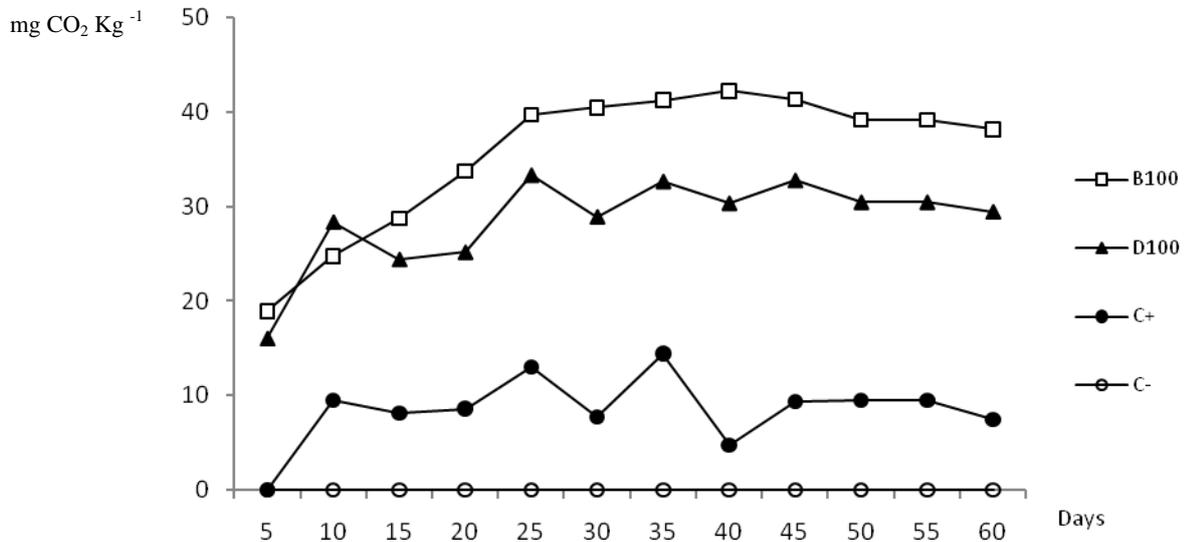
Table 2 - Values of CO₂ released in the samples of soil contaminated with B5, B20, B50, B100 and D100, and uncontaminated soil.

SAMPLES	Initial value of CO₂ released(mg CO₂ kg⁻¹)	Maximum value of CO₂ released(mg CO₂ kg⁻¹)
B5	32,67	38,39
B20	29,37	33,66
B50	31,35	41,47
B100	30,58	42,35
D100	27,72	33,77
C+	10,67	15,51

Table 3 - Determination of microbial biomass C (SMB-C) after 30 days of incubation of contaminated samples and control sample.

Treatments	30 days of incubation (mg C Kg⁻¹)
Uncontaminated soil	223,15
Soil contaminated with B5	638,72
Soil contaminated with B20	708,67
Soil contaminated with B50	516,33
Soil contaminated with B100	481,24
Soil contaminated with D100	516,33

a)



b)

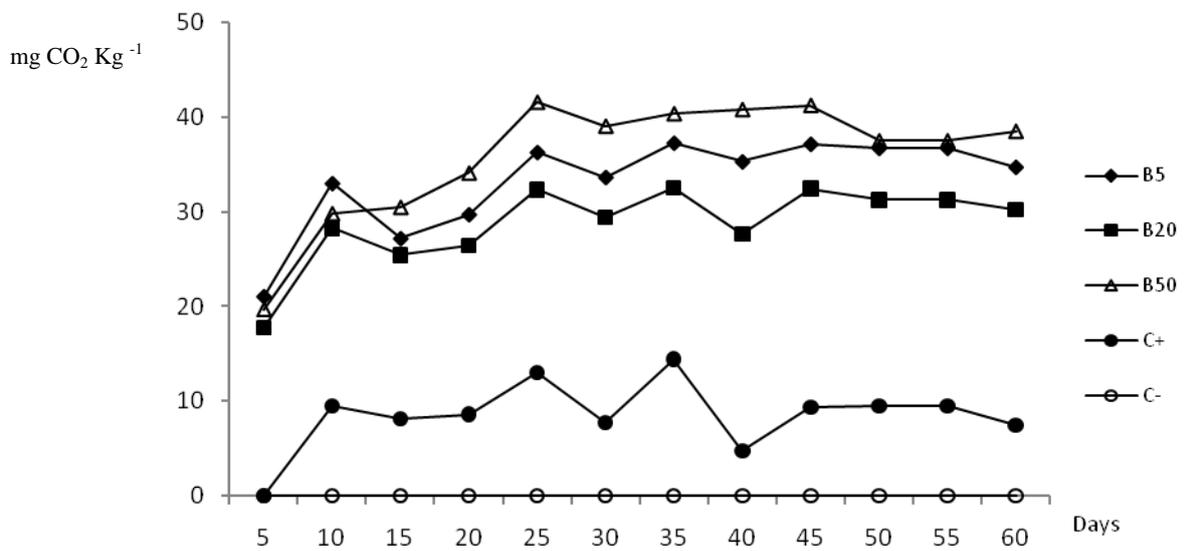


Figure 2 - Respiration (mgCO₂ kg⁻¹) during microcosms experiments with B100 and D100 (a) and B5, B20, B50 (b). Comparing the samples contaminated with the pure fuels and control samples without contamination.

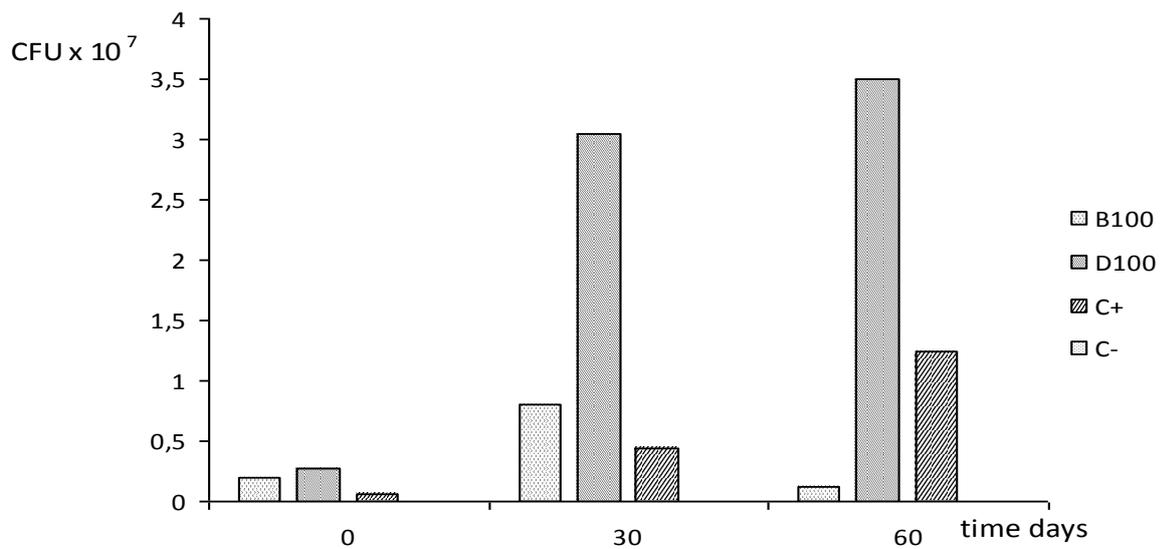
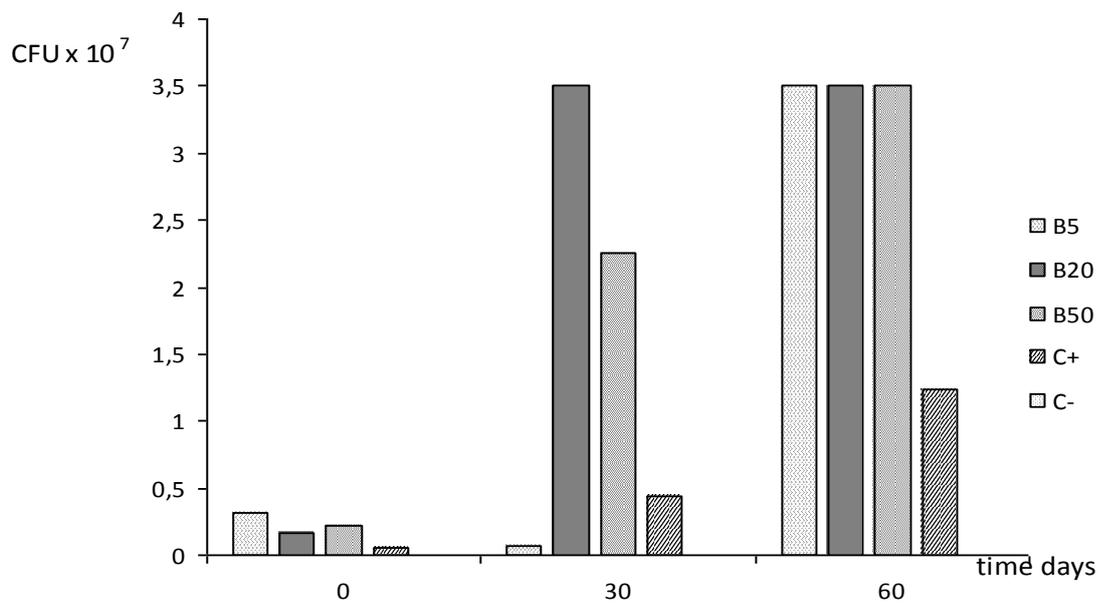


Figure 3 – Comparative analysis of the microbial community in soils from disturbed and undisturbed environments. Soil samples from microcosms (inoculate soil) and from undisturbed (control soil), located at the tropical northeast region of Brazil, properly diluted and set to grow in Heterotrophic media.



Figure 4- DGGE of the region D-1 of the 26S rRNA gene amplified using *primers* for eukaryotes NL1GC and LS2 on an 8% (w/v) polyacrylamide gel (37.5:1 acrylamide:bisacrylamide) consisting of a 35-70% denaturing concentrate (100% denaturing agent corresponds to 7 M urea and 40% (v/v) deionized formamide). Bands were visualized by staining with silver nitrate. Each band was considered an operational taxonomical unit (OTU).

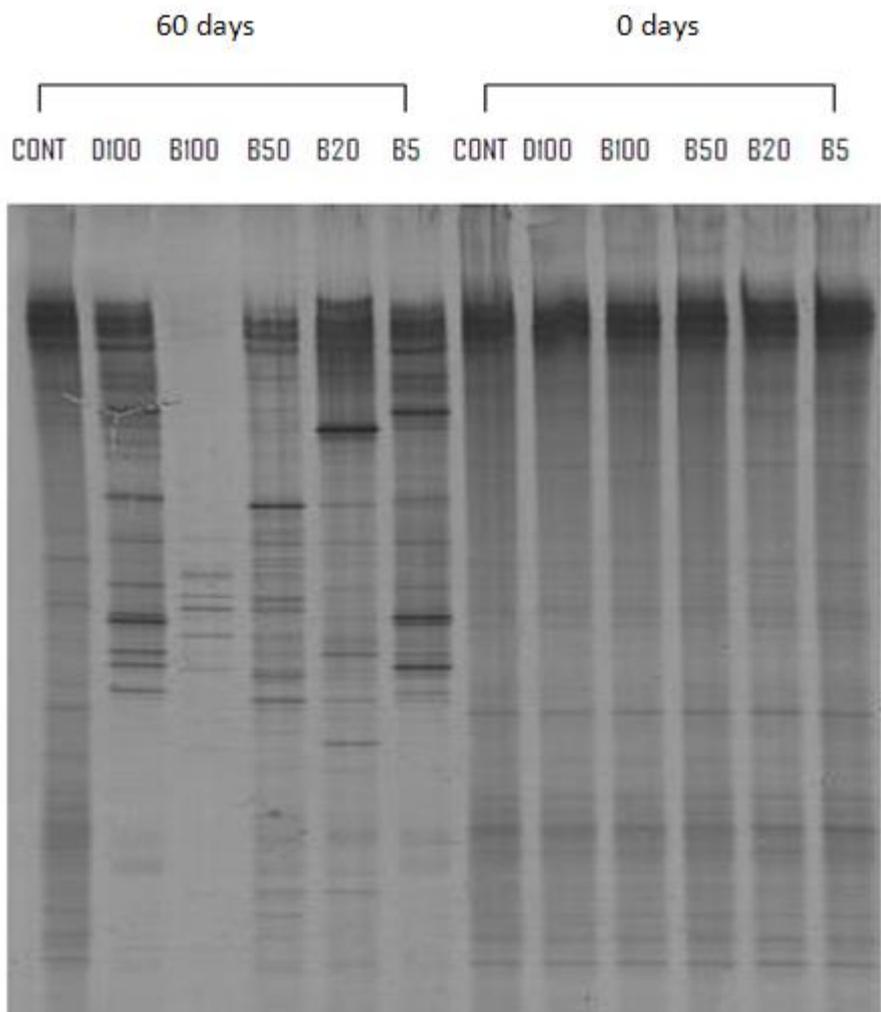


Figure 5: DGGE of the V3 region of 16S rRNA, using a gel poiliacrilamida to 8% and degree of denaturation of 40 to 70%. In this gel, there is a difference in the profiles of microbial communities in the initial analysis and the final period.

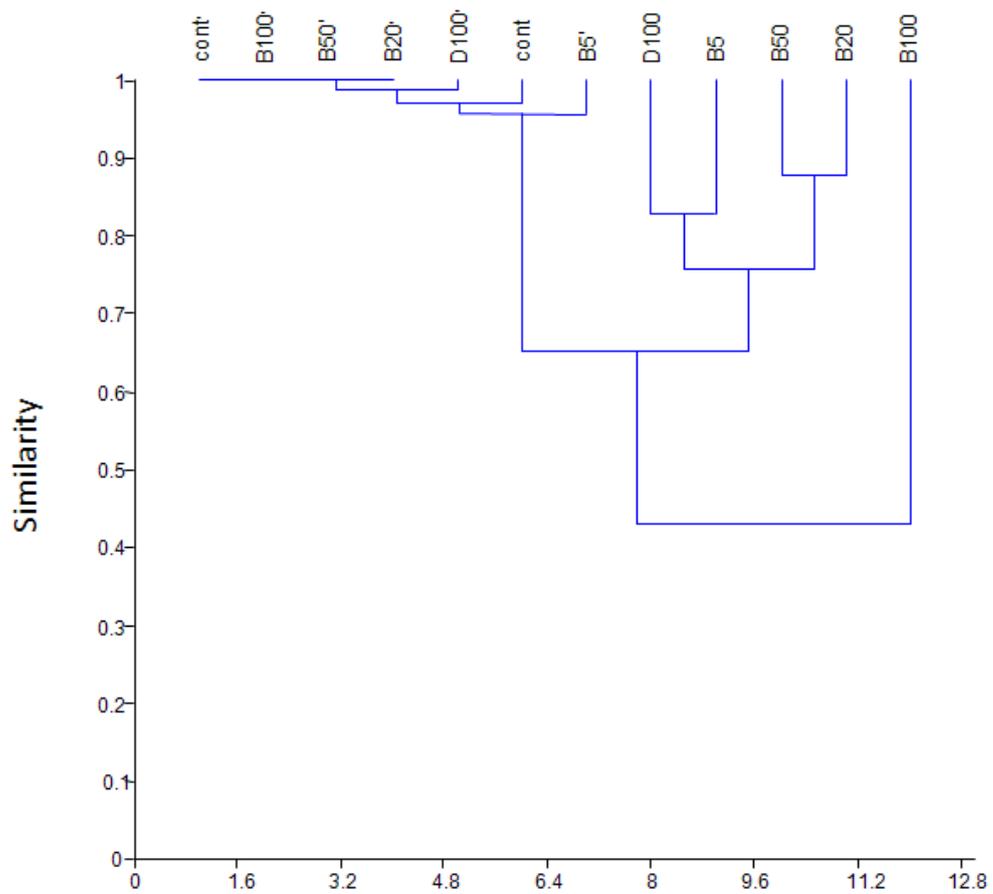


Figure 6: Dendrogram representative of the similarity between the communities present in samples analyzed using DGGE.

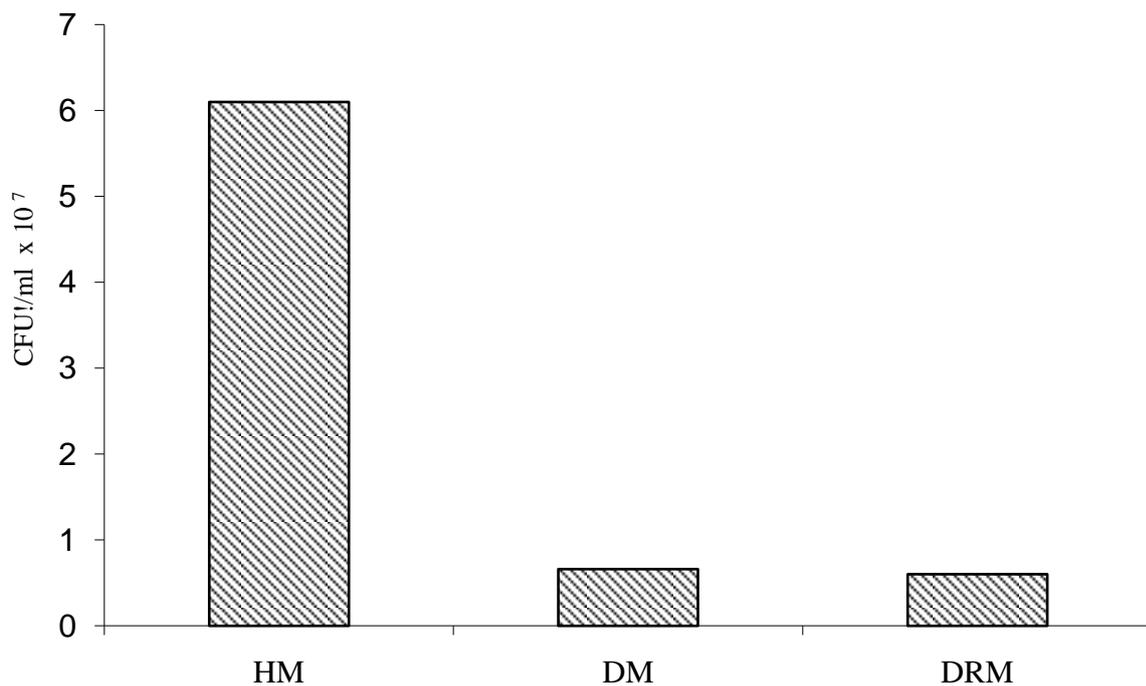


Figure 7 : Comparative analysis of the indigenous microbial community in soils from disturbed and undisturbed environments. Soil samples from microcosms (disturbed) and from an undisturbed, located at the tropical northeast region of Brazil, properly diluted and set to grow in Heterotrophic media (HM), Degradation minimum media (DM) and Degradation rich media (DRM) for analysis and counting of colonies. The procedures were repeated three times for the standard deviation bars.

(A) – microbial growth in DM; (B) – microbial growth in RM

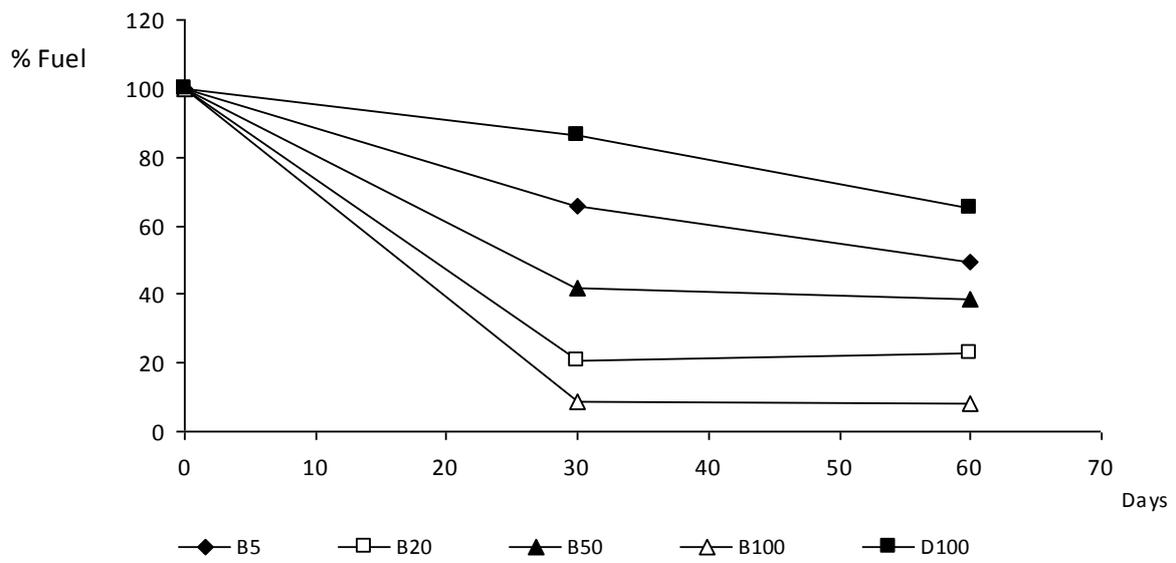
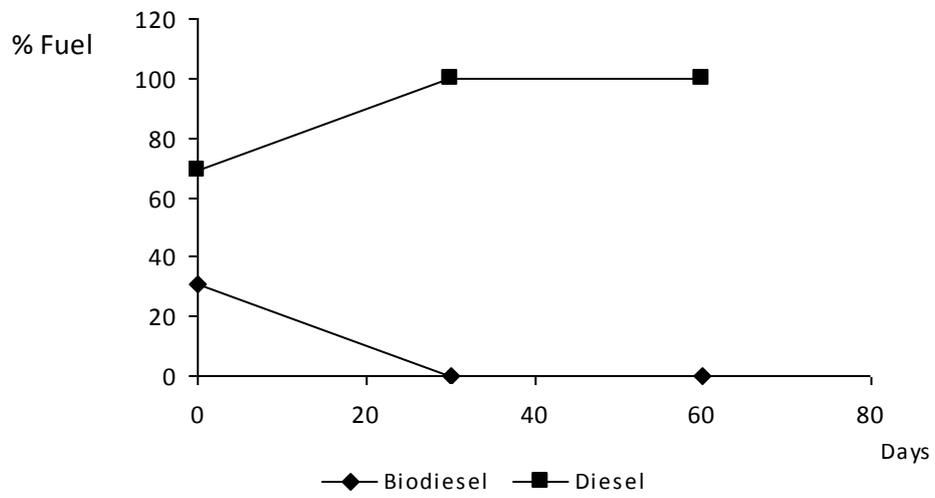


Figure 8: Chromatographic analysis of fuel present in the microcosms containing soils contaminated with mixtures B5, B20, B50, B100 and D100. The process of degradation was accompanied at times 0, 30 and 60 days.

a)



b)

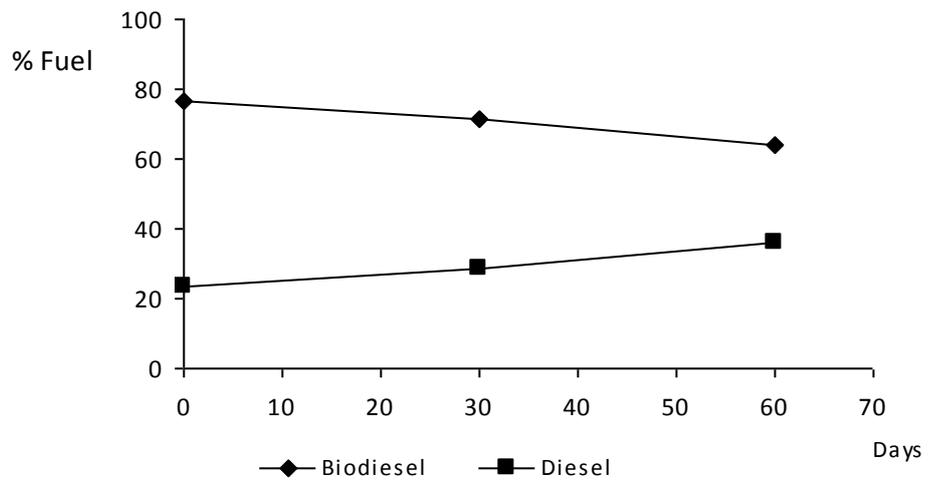
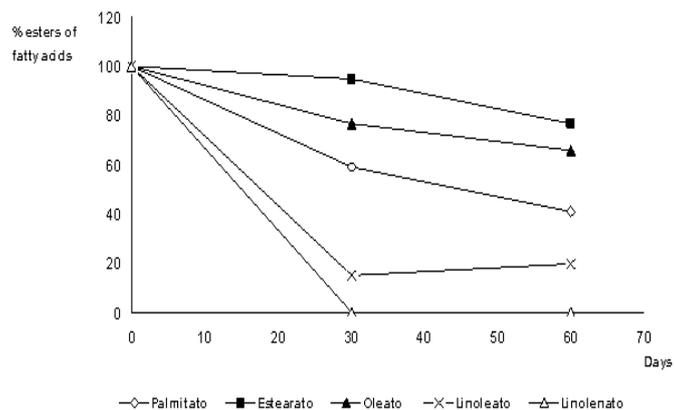
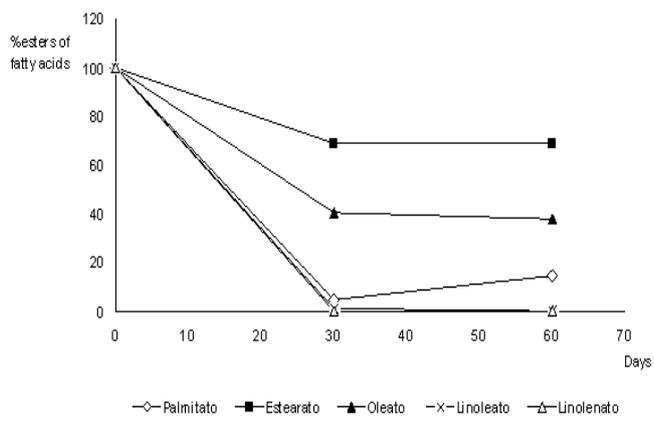
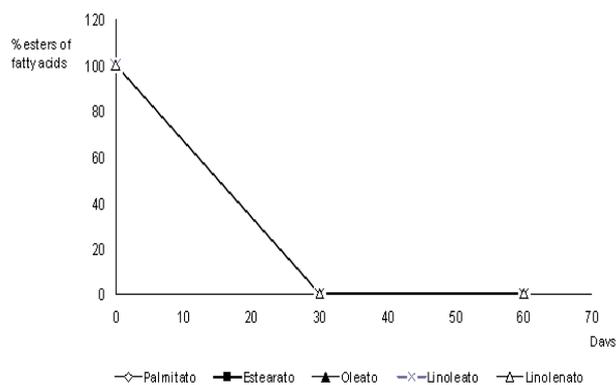
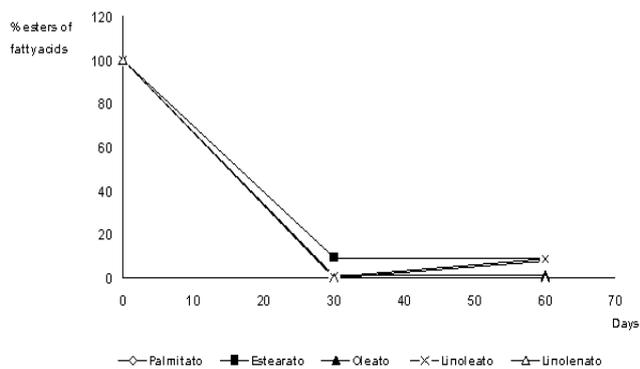


Figure 9: Comparison of percentage of diesel fuel and biodiesel in blends B5 (6a) and B50 (6b) in the samples during the 60 days of incubation.



a

b



c

d

Figure 10: Comparative analysis of the concentrations of fatty acid esters B100 (a), B50 (b), B20 (c) and B5 (d) into the soil after 0, 30 and 60 days of incubation.

References

- Atlas, R.M. (1981) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbiol. Rev.*, **45**, 180–209.
- Bertrand, J.C.; Rambeloarsoa, J.F.; Rontani, G.; Giusti, G.; Mattei, G. (1983) Microbial Degradation of Crude Oil in Sea Water in Continuous Culture. *Biotec. Lett.*, **5**, 567 – 572.
- Birchall, C., Newman, J.R. (1995) Degradation and phytotoxicity of biodiesel oil. Institute of arable Crops Research Report, Long Ashton Research Station, Bristol, UK, p. 50.
- Burger, A. E. (1993) Estimating the mortality of seabirds following oil-spills-effects of spill volume. *Mar.Poll. Bull.*, **26**, 140-143.
- Burger, T.; Boyer-Kendrick, T.; Dolny, D. (2000) Complex training compared to a combined weight training and plyometric training program. *J. Streng. Cond. Res.*, **14(3)**, 360.
- Burns, K. A.; Garrity, S. D.; Levings, S. C. (1993) How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil-spills. *Mar. Poll. Bull.*, **26**, 239-248.
- Davis, C.; Cort, T.; Dai, D.; Illangasekare, T.H.; Munakata-Marr, J. (2003) Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel. *Biodegradation*, **14**, 373–384.
- DeMello, J.A.; Carmichael, C.A.; Peacock, E.E.; Nelson, R.K.; Arey, J.S.; Reddy, C.M. (2007) Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: an initial study. *Mar. Pollut. Bull.*, **54**, 894–904.
- Fernández-álvarez, P.; Vila, J.; Garrido-Fernández, J.; Grifoll, M.; Lema, J.M. (2006) Trials of biorremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *J. Hazard Mater*, **137**, 1523-1531.
- Fukuda, H.;Kondo, A.; Noda, H. (2001) Biodiesel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioengi.* **92**: 405-416.
- Heuer H.; Krsek M.; Baker P.; Smalla K.; Wellington, E.M.H. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3233-3241.
- Kaieda, M.; Samukawa, T.; Matsumoto, T.; Ban, M.; Kondo, A.; Shimada, Y. (1999) Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water - containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* **88(6)**, 627-631.
- Knothe, G.; Bagby, M.O.; Ryan, T.W. (1997) Cetane numbers of fatty compounds: influence of compound structure and of various potential cetane improvers. *Soc. Aut. Eng. Techn.* Paper No. 971681.

Kusdiana, D.; Saka, S. (2004) Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment. *Bioresour. Technol.*, **91**, 289-295.

Lapinskiene, A.; Martinkus, P.; Rebzdaite, V. (2006) Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Envir. Poll.*, **142**, 432-437.

Li, G.; Huang, W.; Lerner, D. N.; Zhang, X. (2000) Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Wat. Res.*, **34**, 3845-3853.

Louwrier, A. (1998) Biodiesel tomorrow's liquid gold. *Biologist.*, **45**, 17-21.

Maciel, B. M. ; Santos, A.C.F. ; Dias, J.C.T. ; Vidal, R.O. ; Dias, R.J.C. ; Gross, E.; Cascardo, J.C.M.; Rezende, R.P. (2009) Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. *Genet. Mol. Res.*, **8**, 375-388.

Miller, N.J.; Mudge S. M. (1997) The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. *Spill. Sci. Tech. Bull.*, **4**, 17-33.

Monyem, A.; Van Gerpen, J. H. (2001) The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biom. Bioen.*, **20**, 317-325.

Morgan, P.; Watkinson. (1989) Hydrocarbon degradation in soils and methods for biotreatment. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **8**, 305-333.

Mudge, S.M.; Pereira, G. (1999) Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. *Spill sci. Technol. Bull.* 5, 353-355.

Nouredine, M.A.; Qin, X.J., Oliveira, S.A.; Skelly, T.J.; Van der Walt, .; Hauser, M.A.; Pericak-Vance, M.A.; Vance, J.M.; Li, Y.J. (2005) Association between the neuron-specific RNA-binding protein ELAVL4 and Parkinson disease. *Hum Genet.*, **117**, 27-33.

Pasqualino, J.C.; Montané, D.; Salvadó, J. (2006) Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biom.Bioen.*, **30**, 874-879.

Penet, S.; Vendeuvre, C.; Bertoncini, F.; Marchal, R.; Monot, F.; (2006) Characterisation of biodegradation capacities of environmental micro floras for diesel oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Biodegradation*, **17**, 577-585.

Prince, R.C.; Parkerton, T.F.; Lee, C. (2007) The primary aerobic biodegradation of gasoline hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 3316-3321.

Prince, R.C.; Haitmanek, C.; Lee, C.C. (2008) The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere*, **71**, 1446-1451.

Santos, M.A. Inserção do biodiesel na matriz energética brasileira: Aspectos técnicos e ambientais relacionados ao seu uso em motores de combustão. São Paulo:USP, 2007 (Dissertação de Mestrado).

Sheffield, V. C.; Cox, D. R.; Lerman, L.S.; Myers R.M. (1989) Attachment of a 40- base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 232-236.

Suehara, K.; Kawamoto, Y.; Fujii, E.; Kohda, J.; Nakano, Y.; Yano, T. (2005) Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. *J Biosci Bioeng*, **100**, 437–442.

Swannell, R.P.J.; Lee, K.; Mcdonagh, M. (1996) Field evaluation of marine oil spill biorremediaion. *Microbiol. Rev.*, **60**, 342-365.

SMITH, M.R. (1990) The Biodegradation of aromatics Hydrocarbons by Bacteria. *Biodegradation*, **1**, 191 – 206,

Vance, E.D.; Brookes, P.C.; Jenkinson, D.S. (1987) Na extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 703-707.

Walter, M. V.; Crawford, R. L. (1997) Overview: biotransformation and bodegradation. In: Manual of Environmental microbiology(Hurst, C. J>, Knudsen, G. R., <clnerney, M. J. , Stetzenbach, L. D. aand Walter, M. V. eds.) *Amer. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC*. 707-708.

Wang, W.G.; Lyons, D.W.; Clark, N.N.; Gautam, G.; Norton, P.M. (2000) Emissions from nine heavy trucks fueled by diesel and biodiesel blend without engine modification. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 933-939.

Warabi, Y.; Kusdiana, D.; Saka, S. (2004) Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapessed oil in supercritical alcohols. *Bioresour. Technol.*, **91**, 283-287.

Zhang, Y.; Dube, M.A.; Mclean, D.D.; Kates, M. (2004) Biodiesel production from waste cooking oil. 1. Process design and technological assessment. *Bioresour. Technol.* **89**, 1-16.

Zhang, X.; Peterson, C.; Reece, D.; Haws, R.; Moller, G. (1998) Biodegradability of biodiesel in the aquaric environment. *Trans. ASAE*, **41**, 1423-1430.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível confirmar a maior facilidade de biodegradação do biodiesel pelos microrganismos do solo em relação ao diesel. Foi constatado também a influencia da concentração do biodiesel no processo de degradação das misturas biodiesel/diesel. Em comparação ao ambiente aquático, a biodegradação do biodiesel é mais lenta no sistema terrestre. No entanto, poucos estudos são realizados em solos. É necessário estudar o processo da degradação do biodiesel, levando em consideração diferentes concentrações de contaminação, as diferentes composições do biodiesel, e a diversidade dos tipos de solo para uma melhor compreensão desse processo.

REFERÊNCIAS

- Ausma, S.; Edwards, G.C.; Gillespie, T.J. (2003) Laboratory-scale measurement of trace gas fluxes from landfarm soils. *J. Environ. Qual.*, **32**, 8-22.
- Birchall, C.; Newman, J.R. (1995) Degradation and phytotoxicity of biodiesel oil. Institute of arable Crops Research Report, Long Ashton Research Station, Bristol, UK, p. 50.
- Blum, W.H. (1997). Basic concepts: degradation, resilience and rehabilitation. In: Lal, R., Blum, W.H., Valentine, C., Steward, B.A. (Eds.), *Methods for Assessment of Soil Degradation*. CRC Press, New York, USA, pp. 1–16.
- Brohon, B.; Delolme, C.; Gourdon, R. (2001) Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 883– 891.
- Bobbie, R.J.; White, D.C. (1980) Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 1212-1222.
- Boczar, B.A.; Begley, W.M.; Larson, R.J. (1992) Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases, *Wat. Environ. Research*, **64**, 792-796
- Brinkhoff, T.; Muyzer, G. (1997) Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3789–3796.
- Burger, A.E. (1993) Estimating the mortality of seabirds following oil-spills-effects of spill volume. *Mar. Poll. Bull.*, **26**, 140-143.
- Burns, K.A.; Garrity, S.D.; Levings, S.C. (1993) How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil-spills. *Mar. Poll. Bull.*, **26**, 239-248.
- Chosson, P.; Lanau, C.; Connan, P.; Dessort, D. (1991) Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. *Nature*, **351**, 640–642.
- Coutinho, H.L.C.; Oliveira, V.M.; Manfio, G.P.; Rosado, A.S. (1999) Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological inovations. *An. Acad. Bras. Ci.*, **71**, 3, 491-503.
- Cunha, C. D.; Leite, S. G. F. (2000) Gasoline Biodegradation in different soil microcosms. *Braz. Jour. Microbiol.*, **31**, 45-49.
- Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicek, D. F.; Stewart, B. A. (1994). Defining soil quality for a sustainable environment. *Madison: Amer. Soc. Agron.*, 244.

- Eitmanaviciute, I. (1995) Pedobionts survival in soils polluted by oil products. *Ecology (Ekologija)* **4**, 70-80(In Lithuanian).
- Fan, S.; Scow, K.M. (1993). Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1911– 1918.
- Ferrari, A.R.; Oliveira, V.S.; Seabio, A. (2005). Biodiesel de soja- Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, **28**, 19-23.
- Field, J.A.; De Jong, E.D.; Costa, G.; De Bout, A.M. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2219– 2226.
- Franco, I.; Contin, M.; Bragato, G.; De Nobili, M. (2004) Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma*, **121**, 17–30.
- Fritze, D. (1996). *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 98–101.
- Gallego, J.L.R.; Loredó J.; Llamas J.F.; Vázquez; S´nchez F.J. (2001). Biorremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, **12**, 325-335.
- Hatfield, J.L.; Stewart, B.A. (1994) *Soil Biology: Effects on Soil Quality*. Lewis Publishers, Cherry Hill.
- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233-3241.
- Jenkinson, D.S. (1976). The effects of biocidal treatments on metabolism in soil: IV. The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **8**, 203– 208.
- Jenkinson, D.S., Ladd, J.N. (1981). Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol. 5. Marcel Dekker, New York, pp. 415– 471.
- Joergensen, R.G.; Schmadeke, F.; Windhorst, K.; Meyer, B. (1995). Biomass and activity of micro-organisms in a fuel oil contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 1137– 1143.
- Lahvis, M.A.; Baehr, A.L.; Baker, R.J. (1999) Quantification of aerobic biodegradation and volatilization rates of gasoline hydrocarbons near the water table under natural attenuation conditions. *Wat. Res. Research*, **35** (3):753-765.
- Langwaldt, J. H.; Puhakka, J. A. (2000) On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environ.Poll.*, **107**, 187-197,

Lapinskiene, A.; Martinkus, P.; Rebzdaite, V. (2006) Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environ. Poll.*, **142**, 432-437.

Larson, W.E.; Pierce, F.J. (1994) The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Sterwart, B.A., eds. Defining soil quality for a sustainable environment. Madison, Soil Science Society of America Special Publication Number, **35**, 37-51.

Lyman, W.J.; Reehi, W.F.; Rosenblatt, D.H. (1990) Handbook of chemical property estimation methods- Environmental behavior of organic compounds, American Chemical Society, Whashington, DC.

Maciel, B. M. Estudos Prospectivos de Microrganismos de solo de landfarm com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. Ihéus: UESC, 2004.

Maciel, B. M.; Dias, J.C.T.; Santos, A.C.F.; Argôlo Filho, R.C.; Fontana, R.; Loguercio, L.L.; Rezende, R.P. (2007) Microbial surfactant activities from a petrochemical landfarm in a humid tropical region of Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**, 937-943.

Maciel, B. M.; Santos, A.C.F.; Dias, J.C.T.; Vidal, R.O.; Dias, R.J.C.; Gross, E.; Cascardo, J.C.M.; Rezende, R.P. (2009) Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. *Genet. Mol. Research*, **8**, 375-388.

Marschner, B.; Kalbitz, K. (2003). Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma*, **113**, 211 – 235.

Margesin, R.; Schinner, F. (2001) Bioremediation (Natural Attenuation and Bioestimulation) of Diesel-Oil-Contaminated soil in a alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67(7)**, 3127-3133.

Margesin, R.; Zimmerbauer, A.; Schinner, F. (2000) Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, **40**, 339- 346.

Mariano, A.P; Tomasella, R.C.; Oliveira, L.M.; Contiero, J.; Angelis, D.F. (2008) Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *African Journal of Biotechn.*, **7(9)**, 1323-1328.

Meyer, R.M.; Teske, S.G.; Wirsén, C.O.; Jannasch, H.W. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3131-3145.

Miller, N.J., Mudge, S.M. (1997) The effect of biodiesel on the rate of removal and weathering characteristics of crude oil within artificial sand columns. *Spill Sci. Technol. Bull.*, **4**, 17–33.

Mudge, S.M.; Pereira, G. (1999) Stimulating the biodegradation of crude oil with biodiesel preliminary results. *Spill Sci. Technol. Bull.*, **5**, 353-355.

Muyzer, G.; De Waal, E.C.; Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3, 695-700,

Muyzer, G.; Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek*, **73**, 127-141.

Nybroe, O.; Einarson, K.; Ahl, T. (1996) Growth and viability of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 in seawater as affected by substrate and nutrient amendment. *Lett. Appl. Microbiol.*, **22**, 366–370.

Nübel, U.; Garcia-Pichel, F.; Kühl, M.; Muyzer, G. (1999) Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16s rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 422-430.

Powelson, D.S. (1993). Soil microbial biomass: before, beyond and back. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (Eds.), *Beyond the Biomass*. Wiley, Chichester, UK, pp. 3– 20.

Rajendran, N.; Matsuda, O.; Imamura, N.; Urushigawa Y. (1992) Variation in microbial biomass and community structure in sediments of eutrophic bays as determined by phospholipid ester-linked fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 562–571.

Ron, E.Z.; Rosenberg, E. (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 249-252.

Rosato, B.Y. (1997) Biodegradação do petróleo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 307-334.

Ruggiero, P.; Pizzigallo, M.D.R.; Crecchio, C. (2001). Effects of soil abiotic processes on the bioavailability of anthropogenic organic residues. In: Violante, A., Huang, P.M., Bollag, J.M., Gianfreda, L. (Eds.), *Soil Mineral–Organic Matter– Microorganisms Interactions and Ecosystem Health*. Development in Soil Science Series, vol. 28B. Elsevier, pp. 95– 133.

Seabra, P.N. (2001) Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. In Melo, I.S.; Silva, C.M.M.S.; Scramin, S.; Spessoto, A. *Biodegradação*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 41-59.

Teske, A.; Wawer, C.; Muyzer, G.; Ramsing, N.B. (1996) Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1405-1415.

Pinto, A.C.; Guarieiro, L.L.N.; Rezende, M.J.C.; Ribeiro, N.M.; Torres, E.A.; Lopes, W.A.; Pereira, P.A.P.; Andrade, J.B. (2005) Biodiesel: Na *Overview*. *J. Braz. Chem. Soc.* **16(6b)**, 1313-1330.

Powlson, D.S. (1994) The soil microbial biomass: Before, beyond and back. In: K. Ritz, J. Dighton and K.E. Giller, Editors, *Beyond the Biomass*, Wiley, Chichester, pp. 1–20.

Prince, R. C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Rev. Microbiol.*, **19(4)**, 217-242.

Prince, R.C.; Haitmanek, C.; Lee, C.C. (2008) The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere*, **71**, 1446-1451.

Zhang, X.; Peterson, C.; Reece, D.; Haws, R.; Møller, G. (1998) Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *American Society of Agricultural Engineers*, **41**, 1423–1430.

Zak, J.; Willig, M.R.; Moorhead, D.L.; Wildman, H.G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.*, **26**, 1101–1108.

<http://.cti2000.it/biodiesel/biodegradabilit% E0.htm>

<http://www.biodiesel.gov.br/>

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](#)