

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

Área de concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente

Tese de Doutorado

EFEITOS DA ADIÇÃO E DA BIOESTIMULAÇÃO DA  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES *IN SITU*,  
DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO ARGILOSO  
CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL-B10

Andressa Decesaro

Passo Fundo

2021



CIP – Catalogação na Publicação

---

D292e Decesaro, Andressa

Efeitos da adição e da bioestimulação da produção de biossurfactantes *in situ*, durante a biorremediação de solo argiloso contaminado com óleo diesel-B10 / Andressa Decesaro. – 2021.

84 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Thomé.

Tese (Doutora em Engenharia) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Solos - Poluição. 2. Hidrocarbonetos. 3. Biorremediação. 4. Surfactantes. I. Colla, Luciane Maria, orientadora. II. Thomé, Antônio, coorientador. III. Título.

CDU: 628.516

---

Catalogação: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

ANDRESSA DECESARO

EFEITOS DA ADIÇÃO E DA BIOESTIMULAÇÃO DA  
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES *IN SITU*,  
DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO ARGILOSO  
CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL-B10

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do grau de Doutor em Engenharia.

Data de aprovação: 06 de abril de 2021.

Doutora Luciane Maria Colla

Orientadora

Universidade de Passo Fundo – UPF

Doutor Antônio Thomé

Coorientador

Universidade de Passo Fundo – UPF

Doutora Fátima Menezes Bento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Doutora Helen Treichel

Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Doutor Cleomar Reginatto

Universidade de Passo Fundo – UPF

Passo Fundo

2021

*Aos meus pais Marlene e Armando,  
e ao meu companheiro de vida, Cristiano.  
Pelo apoio de todos os dias e por sempre acreditarem em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus! Pelo dom da vida renovado em cada amanhecer e pela força para seguir em frente.

Aos meus pais, Marlene e Armando, por todas as orações, cuidado e ajuda, pelo amor incondicional, paciência e perseverança de estar sempre junto, apoiando e incentivando.

Aos meus irmãos, Diana e Felipe, e meus cunhados Moacir e Débora, pelos abraços, conversas e amor sincero.

Aos meus pequenos, Nycolas e Antonella, por todo o amor e carinho com a tia Andressa, vocês são minha fonte de alegria e energia.

Ao meu companheiro de vida, Cristiano, pelo amor e carinho. Por toda a sua ajuda nos momentos difíceis, por ser meu confidente e meu amigo. Muito obrigada pelo companheirismo, paciência, lealdade e compreensão durante todos esses anos. Sou muito grata por tudo que faz por mim, obrigada, mais uma vez!

Aos meus queridos e sempre ajudantes de todas as horas, Thaís, Bruna, Ângela e Alan, pelos inúmeros dias de trabalho no laboratório, pelas noites de escritas de artigos, pela ajuda e amizade. Já disse outra vez, mas volto a repetir, sem a ajuda de vocês não teria conseguido chegar até aqui.

À Professora Doutora Luciane Maria Colla, ou simplesmente Prof. LU, por ser muito mais que uma orientadora, por ter me acompanhado durante todos esses anos, pelos seus conselhos valiosos e sempre certos, e pela sua amizade. Obrigada pela compreensão nos momentos turbulentos, pela paciência e confiança depositada em meu trabalho. Obrigada Prof. LU, por nunca ter desistido de mim.

Ao Professor Doutor Antônio Thomé que sempre colaborou e ajudou no que foi preciso, meu muito obrigado.

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação, que me ofereceram estrutura para o trabalho científico, professores e funcionários qualificados, ambiente propício ao aprendizado, o que me possibilitou ter experiências incríveis, além de fazer muitos amigos.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização deste estudo.

## RESUMO

O óleo diesel é um dos combustíveis mais utilizados em todo o mundo. Vazamentos de óleo diesel em tanques de armazenamento subterrâneos, durante o transporte e distribuição representam importante fonte de contaminação do solo e do aquífero. O tratamento de solo contaminado com diesel pode ser realizado por meio de métodos físicos, químicos e também biológicos. A biorremediação, é considerada promissora, por ser uma técnica biológica que pode ser aplicada em grandes áreas contaminadas. Acrescido, tem-se que a pesquisa sobre a influência de biossurfactantes na eficiência da biorremediação de solo contaminado está crescendo continuamente. No entanto, apesar dos constantes avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos dos biossurfactantes, ainda existem muitos fatores que não estão suficientemente elucidados. Há uma falta de pesquisas sobre o metabolismo microbiano autóctone ou exógeno quando a bioestimulação ou bioaugmentação é realizada para produzir biossurfactantes em locais contaminados. Desta forma, este estudo teve como objetivo geral, a avaliação da produção de biossurfactante no solo e verificar a influência dos biocompostos sobre o processo de retenção e biodegradação do contaminante. Inicialmente, produziu-se surfactina através de fermentação submersa utilizando a bactéria *Bacillus methylotrophicus* e soro de leite como meio de cultivo, para desenvolver metodologias de mensuração de biossurfactantes em meio aquoso. O biossurfactante produzido foi adicionado em solo e realizados estudos de desenvolvimento de metodologia de extração do biocomposto do solo e a sua mensuração. Em uma segunda etapa, investigou-se a retenção de óleo diesel-B10 (B10: 90% diesel; 10% biodiesel) em solo argiloso durante a bioestimulação por biossurfactantes bacterianos (surfactina ou ramnolipídio). Na terceira fase do estudo, realizou-se a biorremediação em solo contaminado com 20% de óleo diesel-B10, utilizando como estratégias de bioestimulação e bioaugmentação para estimular a produção de biossurfactantes no solo. Foram produzidos biossurfactantes na quantidade de interesse, utilizados para a elaboração das curvas padrão pela tensão superficial e método de Biureto. Com relação ao efeito da adição de biossurfactantes (surfactina e ramnolipídio) no solo sobre a retenção, verificou-se que não foi um fator significativo nas concentrações utilizadas, e não interferiu na adsorção do contaminante. Assim, pode-se dizer que a inserção dos biossurfactantes em quantidade suficiente para uma biorremediação efetiva não afeta a percolação do contaminante no solo. No ensaio de biorremediação com óleo diesel, o tratamento com aplicação de bioestimulação e bioaugmentação em conjunto apresentou 61,66% de remoção total ao final de 120 dias de experimento. A produção de biossurfactantes no solo, avaliada pela medida da tensão superficial dos extratos de solo, apresentou redução da tensão superficial para os tratamentos de bioaugmentação e bioestimulação (11,82%), indicando a liberação de biossurfactantes no meio. Esta tendência não foi observada nos tratamentos de atenuação natural e controle. Para o solo estéril, os valores referentes a adsorção ficaram em torno de 20%, não diferindo estatisticamente entre si, demonstrando que os diferentes bioestimulantes não promoveram diferentes taxas de adsorção do contaminante, corroborando com o estudo anterior. Desse modo, verificou-se que a aplicação em conjunto das técnicas de bioestimulação e bioaugmentação auxiliaram na produção de biossurfactantes diretamente no solo e aumentaram a biodegradação do óleo diesel em solo.

**Palavras-chaves:** solo contaminado; hidrocarbonetos; biodegradação; surfactante microbiano.

## ABSTRACT

Diesel oil is one of the most widely used fuels worldwide. Diesel oil leaks in underground storage tanks during transport and distribution represent an important source of soil and aquifer contamination. The treatment of soil contaminated with diesel can be carried out by means of physical, chemical and also biological methods. Bioremediation is considered promising, as it is a biological technique that can be applied to large contaminated areas. In addition, research on the influence of biosurfactants on the efficiency of contaminated soil bioremediation is growing steadily. However, despite constant advances in understanding the mechanisms involved in the effects of biosurfactants, there are still many factors that are not sufficiently elucidated. There is a lack of research on autochthonous or exogenous microbial metabolism when biostimulation or bio-enhancement is performed to produce biosurfactants in contaminated sites. Thus, this study had as its general objective, the evaluation of the production of biosurfactant in the soil and to verify the influence of biocomposites on the process of retention and biodegradation of the contaminant. Initially, surfactin was produced through submerged fermentation using the bacteria *Bacillus methylotrophicus* and whey as a culture medium, to develop methodologies for measuring biosurfactants in aqueous medium. The biosurfactant produced was added to the soil and studies were carried out to develop a methodology for extracting the biocomposite from the soil and its measurement. In a second step, we investigated the retention of diesel oil-B10 (B10: 90% diesel; 10% biodiesel) in clayey soil during biostimulation by bacterial biosurfactants (surfactin or rhamnolipid). In the third phase of the study, bioremediation was carried out on soil contaminated with 20% diesel-B10 oil, using bio-stimulation and bio-augmentation strategies to stimulate the production of biosurfactants in the soil. Biosurfactants were produced in the amount of interest, used for the elaboration of standard curves by surface tension and Biuret method. Regarding the effect of adding biosurfactants (surfactin and rhamnolipid) on the soil on retention, it was found that it was not a significant factor in the concentrations used, and did not interfere with the adsorption of the contaminant. Thus, it can be said that the insertion of biosurfactants in sufficient quantity for an effective bioremediation does not affect the percolation of the contaminant in the soil. In the bioremediation test with diesel oil, the treatment with the application of biostimulation and bioincrease together showed 61.66% of total removal at the end of 120 days of the experiment. The production of biosurfactants in the soil, evaluated by measuring the surface tension of the soil extracts, showed a reduction in the surface tension for the bio-enhancement and biostimulation treatments (11.82%), indicating the release of biosurfactants in the medium. This trend was not observed in natural attenuation and control treatments. For sterile soil, the values referring to adsorption were around 20%, not differing statistically from each other, demonstrating that the different biostimulants did not promote different rates of adsorption of the contaminant, corroborating with the previous study. Thus, it was found that the joint application of biostimulation and bioincrease techniques helped in the production of biosurfactants directly in the soil and increased the biodegradation of diesel oil in the soil.

**Keywords:** soil contaminated; hydrocarbons; biodegradation; microbial surfactant.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2	CAPÍTULO I: Biosurfactants during <i>in situ</i> bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation .....	14
3	CAPÍTULO II: Avaliação de metodologias para quantificação de biossurfactante em solo .....	15
3.1	Introdução.....	15
3.2	Materiais e métodos.....	16
3.2.1	Produção de biossurfactantes com <i>Bacillus methylotrophicus</i> .....	16
3.2.2	Desenvolvimento da metodologia para mensuração de biossurfactantes em meio aquoso .....	17
3.3	Resultados e discussão .....	19
3.3.1	Produção de biossurfactantes a partir de <i>Bacillus methylotrophicus</i> .....	19
3.3.2	Padronização de metodologias para determinação de biossurfactantes em meio aquoso .....	22
3.4	Conclusão .....	29
3.5	References .....	29
4	CAPÍTULO III: Application of two bacterial surfactants in clayey soil: effects on diesel oil sorption.....	33
4.1	Introduction .....	33
4.2	Material and methods .....	35
4.2.1	Soil.....	35
4.2.2	Contaminant .....	36
4.2.3	Biosurfactants .....	37
4.2.4	Experimental design .....	37
4.2.5	Specimen molding and rainfall simulation.....	38
4.2.6	Analytical methods .....	40
4.2.7	Statistical analysis of data.....	41
4.3	Results and discussion .....	41
4.4	Conclusions .....	48
4.5	References .....	49
5	CAPÍTULO IV: Biostimulation of the <i>in situ</i> production of biosurfactants during the bioremediation of diesel oil in clayey soil.....	53
5.1	Introdução.....	53
5.2	Material and methods .....	55
5.2.1	Characterization of whey.....	56
5.2.2	Soil.....	56
5.2.3	Bioremediation assay.....	56
5.2.4	Statistical analysis of data.....	58
5.3	Results and discussion .....	59
5.3.1	Microbial growth during bioremediation .....	59
5.3.2	Removal of the contaminant during bioremediation .....	60
5.3.3	Production of biosurfactant in the soil during bioremediation .....	65
5.4	Conclusions .....	67
5.5	Referências .....	67
6	CONCLUSÃO GERAL.....	72
7	REFERÊNCIAS.....	73
8	ANEXOS .....	76



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O avanço da ciência e da biotecnologia ajudaram progressivamente a humanidade na investigação e exploração dos recursos naturais. Diferentes atividades como exploração de petróleo bruto, uso de produtos relacionados a petróleo (querosene, diesel, gasolina), chegada de produtos químicos agrícolas e produtos farmacêuticos facilitaram o estilo de vida das pessoas no mundo todo (Jimoh; Lin, 2020).

Algumas dessas intervenções, entretanto, possuem desvantagens, pois os produtos químicos, metais pesados, solventes, combustíveis e materiais necessários para esses avanços causam efeitos à saúde do meio ambiente, incluindo contaminações no solo (Zhang et al., 2012; Wilton et al. al., 2018).

Ainda não se espera que a frequência de contaminação com óleo diesel no meio ambiente diminua no futuro. Embora o número de tecnologias alternativas e de energia renovável para combustíveis esteja emergindo, não há indicação significativa na diminuição da utilização de combustíveis fósseis. A exploração de combustíveis ainda será executada ativamente pela próxima década, portanto as contaminações por óleo ainda ocorrerão e necessitarão de tecnologias de remediação (Imron et al., 2020).

As contaminações da água e do solo ocorrem principalmente, durante o armazenamento e transporte, causando a contaminação da água e do solo, representando risco para a saúde humana e dos ecossistemas. Os vazamentos provenientes do transporte marítimo representam uma grande parcela das contaminações, como exemplo cita-se o acidente com o navio Exxon Valdez perto de Prince William Sound em março de 1989, onde houve o vazamento de cerca de 40 mil toneladas de óleo bruto. Consequentemente, a ação de descontaminação foi uma das mais caras para um derramamento de petróleo a partir de um navio, com mais de 10.000 trabalhadores atuando nas operações de limpeza. A empresa Exxon Mobil teria gasto em torno US\$ 4,3 bilhões, como consequência do derramamento, incluindo os custos de limpeza e vários acordos judiciais (Arroz, et al., 1996).

O óleo diesel, segundo Ahmed; Fakhrudin (2018), possui um número de cadeias de carbono que varia de 11 a 25 e o intervalo de destilação está entre 180 °C e 380 °C. A composição molecular dos hidrocarbonetos no diesel é dividida em três classes diferentes, que são saturadas, insaturadas e aromáticas (Ahmed; Fakhrudin, 2018; Speight, 2015). Nos hidrocarbonetos saturados, todos os átomos de C são de ligação única, enquanto nos hidrocarbonetos insaturados, um ou mais átomos de C são de dupla ou tripla ligação. Essas

classes são divididas novamente em diferentes grupos com base em sua forma, como alcanos, alcenos, aromáticos (mono-aromáticos), tiol e forma polar (Logeshwaran et al., 2018). O diesel contém 2000 a 4000 hidrocarbonetos com aproximadamente 24% de n-alcano, 46% de iso-alcanos + cicloalcanos e 30% de aromático. Em função de sua composição química, o tratamento de um solo contaminado com diesel pode ser realizado por meio de métodos físicos, químicos e também biológicos (Aljuboury et al., 2017). O tratamento físico requer muitos equipamentos e tem custo relativamente alto (Singh; Chandra, 2014; Vidonish et al., 2016). Enquanto isso, o tratamento químico é conhecido por ser eficaz, no entanto precisa ser seguido de um tratamento adicional em termos de resíduos químicos ou lodo resultante, que se não tratados adequadamente, os resíduos químicos podem ter outros efeitos negativos nos ecossistemas, como poluição ambiental, problemas de saúde para animais e seres humanos, além da perda de biodiversidade (Zhang et al., 2018). O tratamento biológico é considerado promissor na solução dos problemas causados pelos tratamentos físico e químico, sendo uma técnica mais ecológica para remediar o ambiente contaminado por óleo diesel. Também pode ser aplicado em grandes áreas contaminadas, ou seja, solo poluído por hidrocarbonetos e derramamentos de óleo no oceano (Jain et al., 2011, Azubuike et al., 2016).

A biorremediação consiste na biodegradação de contaminantes pela população microbiana e se caracteriza em um dos mecanismos significativos pelos quais os contaminantes hidrofóbicos podem ser expelidos ou diminuídos da natureza, através da mineralização bioquímica (Mani; Kumar, 2014; Mnif et al., 2015; Zhao et al., 2018). Devido à natureza extremamente hidrofóbica dos poluentes orgânicos, como o diesel, diferentes fatores como baixa solubilidade em água, fixação nas partículas do solo e baixa disponibilidade biológica de poluentes, restringem a proporção de transferência de massa disponível à biodegradação (Bezza; Chirwa, 2015; Chaprão et al. 2015).

Para a realização da descontaminação destes ambientes de maneira mais rápida e eficiente, a biorremediação pode ser empregada associada a aplicação de biossurfactantes, os quais atuam como coadjuvantes no processo de biodegradação. Os biossurfactantes são compostos anfifílicos, que possuem moléculas com grupo hidrofóbico (repelente à água, como cadeias de hidrocarbonetos insaturados ou saturados ou ácidos graxos) e extremidades hidrofílicas (amantes da água, como ácidos, cátions ou ânions, peptídeos, mono, di ou polissacarídeos), que permeiam as interações da superfície na interface (Sharma et al., 2015).

A biorremediação com a aplicação de biossurfactantes apresenta uma perspectiva além das técnicas convencionais, no entanto, apesar das várias vantagens e das boas propriedades sobre o surfactante químico, a principal desvantagem ainda está relacionada ao alto custo de

produção, baixo rendimento de produção, elevados custos de *downstream* e recuperação (Araujo et al., 2019). Atualmente, a produção comercial de biossurfactantes em grandes quantidades é restrita, pois o custo total de produção no mercado é ainda muito alto. Além disso, as dificuldades em sintetizar grandes quantidades de biocompostos para aplicações ambientais também apresentam limitações (Jimoh; Lin, 2020).

Uma possível alternativa é a estimulação da produção de biossurfactante no solo, pelos microrganismos autóctones, que podem utilizar os nutrientes injetados ou os contaminantes hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos, como substrato para o crescimento, sintetizando compostos como biossurfactantes e enzimas, que por sua vez auxiliam a eficiência de remoção dos contaminantes (Gudiña et al., 2013).

Os biossurfactantes atuam aumentando as taxas de transferência de massa, tornando os poluentes hidrofóbicos mais biodisponíveis para os microrganismos (Whang et al., 2008). Podem também induzir alterações nas propriedades das membranas celulares, resultando numa aderência microbiana aumentada. Este mecanismo é importante quando duas fases imiscíveis (óleo e água) estão presentes e a captação direta do substrato é plausível (Franzetti et al., 2009).

O progresso desta técnica está diretamente associado com o potencial catabólico dos microrganismos presentes na área poluída, aos fatores ambientais e nutricionais, e as características e disponibilidade dos contaminantes (Antizar-Ladislao et al., 2006).

Ainda que se tenham recentes avanços sobre o entendimento dos mecanismos envolvidos na produção de biossurfactantes, existem inúmeros fatores que não estão suficientemente elucidados. Embora se tenha constado que a aplicação de biossurfactantes na biorremediação é altamente benéfica, algumas falhas e limitações foram verificadas ao se aplicar a teoria na prática (Lawniczak et al., 2013). A principal razão é, talvez, a inconsistência entre a função pretendida de biossurfactantes em processos de biorremediação (aumentando a biodisponibilidade de poluentes) e seu real papel na comunidade microbiana autóctone, que ultrapassa os limites da biorremediação.

Outro desafio é o entendimento sobre o comportamento relacionado a sorção do biossurfactante na matriz do solo, já que isto diminuiria a sua concentração e, conseqüentemente, reduziria a eficiência da taxa de degradação do contaminante. Além disso, é necessário elucidar a influência do biossurfactante na retenção do contaminante, sendo que uma maior dessorção do contaminante da matriz do solo poderia aumentar a pluma de contaminação.

Ainda, como um dos problemas relacionados à área, encontram-se as dificuldades de mensuração das pequenas quantidades de biossurfactantes produzidas durante os processos de biorremediação no solo, o que traz dificuldades no entendimento sobre os mecanismos relacionados aos efeitos positivos e negativos da presença destas biomoléculas em solos. Geralmente, a mensuração da produção desses compostos em solos é possível apenas através de técnicas analíticas avançadas, tornando a monitoração de alto custo. Além disso, os tipos de biossurfactantes produzidos são diversos, havendo a necessidade da disponibilidade desses compostos isolados puros para vias de comparação durante o uso das técnicas analíticas.

No entanto, acredita-se que esses temas estão intimamente relacionados, uma vez que a compreensão das múltiplas contribuições dos biossurfactantes, a mensuração e monitoramento da sua produção, juntamente com o entendimento dos diferentes aspectos da população microbiana autóctone é crucial para a sua aplicação com sucesso na remediação de áreas contaminadas.

Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa em Geotecnia Ambiental, do PPGEng-UPF, foi realizada a produção de biossurfactante pela bactéria *Bacillus methylotrophicus*, através de fermentação submersa em meio composto por soro de leite e permeado da ultrafiltração de soro de leite, sendo recuperado e caracterizado como surfactina. Após, a surfactina foi adicionada em solos que haviam sido contaminados por compostos oleosos (20%). A contaminação com 20% de biodiesel (m/m) foi escolhida a fim de se realizar uma simulação de contaminação extensiva com este tipo de combustível, como por exemplo, as que ocorrem em acidentes viários, uma vez que a maior parte da distribuição do biodiesel ocorre via rede rodoviária. Os estudos comprovaram que a adição dos biossurfactantes microbianos foi positiva sobre a degradação do contaminante (Decesaro, 2016, Decesaro et al., 2020, Decesaro, 2016).

Entretanto no decorrer do estudo verificou-se que a técnica para obtenção destes compostos microbianos pode ser onerosa, em função dos nutrientes requeridos e necessidade de controle das condições ambientais nos biorreatores, além da necessidade de processos de recuperação dos biossurfactantes dos meios de cultivo para posterior uso em processos de biorremediação. Então, o grupo de pesquisa realizou novo estudo (Machado et al., 2020), com aplicação de bioestimulação (meios preparados com soro de leite) e bioaumentação (*B. methylotrophicus*), avaliando os efeitos na biorremediação do óleo diesel e evidenciando a produção *in situ* de biossurfactantes, por meio de efeitos na tensão superficial. No estudo, a produção de biossurfactantes *in situ*, apresentou tendência de redução da tensão superficial, após 30 dias, para os tratamentos de bioaumentação e bioestimulação, indicando a liberação

de compostos tensoativos. Com relação a taxa de remoção de óleo diesel obtida pela biorremediação, foi de 60,48% em 60 dias, resultado semelhante aos obtidos pela atenuação natural (59,82%), o que pode ser explicado devido as baixas quantidades de bioestimulantes adicionados e por não se ter seguido a relação ótima C:N.

Desse modo, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a produção de biosurfactante no solo e verificar a influência dos biocompostos sobre o processo de retenção e biodegradação do contaminante.

O presente documento está dividido por capítulos:

- Introdução geral: contextualização do tema e da linha de pesquisa;
- Capítulo I: apresenta uma revisão de literatura sobre o tema, intitulada *Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation*, publicado na revista *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, pág. 20831–2084, 2017;
- Capítulo II: apresenta todos os testes realizados preliminarmente apresentados na Qualificação;
- Capítulo III: apresenta o estudo referentes aos efeitos dos biosurfactantes na sorção do óleo diesel no solo, através do artigo *Application of two bacterial surfactants in clayey soil: effects on diesel oil sorption*, em fase de submissão;
- Capítulo IV: apresenta o estudo referentes aos efeitos da bioestimulação e biorremediação no solo, com verificação da produção do biosurfactante diretamente no solo, através do artigo *Biostimulation of the in situ production of biosurfactants during the bioremediation of diesel oil in clayey soil*, em fase de submissão;
- Conclusão geral: apresentação das conclusões finais do estudo;

Além disso, nos Anexos estão apresentadas outras publicações e comprovante de depósito de Patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, realizadas durante esse período, oriundos de parcerias do grupo de pesquisa e da dissertação de mestrado da autora desta tese de doutorado.

## 2 CAPÍTULO I: Biosurfactants during *in situ* bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation<sup>1</sup>

### Abstract

Research on the influence of biosurfactants on the efficiency of *in situ* bioremediation of contaminated soil is continuously growing. Despite the constant progress in understanding the mechanisms involved in the effects of biosurfactants, there are still many factors that are not sufficiently elucidated. There is a lack of research on autochthonous or exogenous microbial metabolism when Biostimulation or bioaugmentation is carried out to produce biosurfactants at contaminated sites. In addition, studies on the application of techniques that measure the biosurfactants produced *in situ* are needed. This is important because, although the positive influence of biosurfactants is often reported, there are also studies where no effect or negative effects have been observed. This review aimed to examine some studies on factors that can improve the production of biosurfactants in soils during *in situ* bioremediation. Moreover, this work reviews the methodologies that can be used for measuring the production of these biocomposts. We reviewed studies on the potential of biosurfactants to improve the bioremediation of hydrocarbons, as well as the limitations of methods for the production of these biomolecules by microorganisms in soil.

**Keywords:** Contaminated soil. Hydrocarbons. Biodegradation. Microbial surfactant

**doi:** 10.1007/s11356-017-9778-7

---

<sup>1</sup> Andressa Decesaro, Thaís Strieder Machado, Ângela Carolina Cappellaro, Christian Oliveira Reinehr, Antônio Thomé, Luciane Maria Colla

## 3 CAPÍTULO II: Avaliação de metodologias para quantificação de biossurfactante em solo

### 3.1 Introdução

A biorremediação surgiu como uma abordagem direcionada para remediar locais contaminados. É um processo que envolve a ação de microrganismos e suas enzimas para degradar os contaminantes (Karigar; Rao, 2011; Kumar et al., 2019; Sidhu et al., 2019). Neste processo, diferentes microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, podem produzir biossurfactantes. Os biossurfactantes são um grupo estruturalmente único de moléculas tensoativas. Eles têm natureza anfifílica, pois contêm partes polares e apolares em sua estrutura. A porção hidrofóbica inclui monossacarídeo, polissacarídeo, proteínas ou grupo de peptídeos, enquanto a porção hidrofílica contém gordura saturada, gordura insaturada, álcool graxo ou ácido graxo hidroxilado (Saharan et al., 2011). Essas propriedades do biossurfactante o tornam um excelente agente dispersante, emulsificante e espumante (Singh et al., 2020). A emulsificação de óleos ou hidrocarbonetos facilita seu transporte e aumenta sua biodisponibilidade para microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (Xu et al., 2018).

Os biossurfactantes bacterianos são os mais relatados na literatura, principalmente dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., e *Acinetobacter* sp. (Fontes et al., 2008; Jacques et al., 2007), sendo que os compostos produzidos por *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., estão entre os principais biossurfactantes usados na remediação do solo (Sachdev; Cameotra, 2013), portanto, a mensuração de surfactina e ramnolipídeos, em solos contaminados, se torna importante. Contudo é necessário o desenvolvimento de diferentes técnicas de extração e mensuração destes biossurfactantes no solo.

O desafio consiste em extrair o biossurfactante que se encontra junto ao solo, através de técnicas economicamente viáveis e de fácil execução, com posterior mensuração através de métodos sensíveis para medição da concentração do biossurfactante em meio aquoso.

Portanto, ainda se encontram lacunas, sendo necessário estudos para avaliar as complexas interações entre a matriz do solo, biossurfactantes, microrganismos e contaminantes. Decesaro et al. (2017) apresenta esta deficiência existente em pesquisas que avaliam a biorremediação em conjunto com biossurfactantes, sem que se tenha metodologias definidas para a quantificação dos biocompostos em solos. Desse modo, o objetivo do presente

estudo foi avaliar metodologias para mensuração da produção de biossurfactantes diretamente no solo.

## 3.2 Materiais e métodos

A fim de estudar os processos de extração e mensuração dos biossurfactantes, a partir de sua interação com os solos, primeiramente o biocomposto foi produzido em biorreatores, para posteriormente ser adicionado ao solo em concentrações conhecidas, com o objetivo de se conduzirem os experimentos de padronização de metodologias de extração e quantificação.

### 3.2.1 Produção de biossurfactantes com *Bacillus methylotrophicus*

Inicialmente construiu-se a curva de crescimento da bactéria *Bacillus methylotrophicus*, o qual havia sido previamente isolado e identificado por Decesaro et al. (2013), para a verificação do tempo em que permaneceria em fase exponencial. A concentração celular foi obtida a partir da leitura da absorbância a 610 nm, para que a inoculação do microrganismo no meio de cultivo ocorresse na fase de crescimento.

A produção de biossurfactantes foi realizada com a bactéria *Bacillus methylotrophicus*, a qual é conhecida por ser produtora de surfactina.

A produção de surfactina através do *B. methylotrophicus* foi realizada de acordo com Decesaro et al. (2020), a qual utilizou como componente do meio de cultivo o soro de leite. Antes da utilização, o soro de leite foi caracterizado através de análises físico-químicas de proteína (AOAC, 2005), cinzas, gordura, lactose, sólidos totais, umidade, pH e condutividade de acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008).

O inóculo do microrganismo foi preparado em meio PC (*Plate Count*), composto por triptona (5 g/L), extrato de levedura (2,5 g/L) e glicose (1g/L), a partir de tubos contendo o microrganismo isolado em meio PCA (*Plate Count Ágar*) com a finalidade de multiplicação das células para dar início ao processo fermentativo. Em erlenmeyers de 250 mL foi adicionado 50 mL do meio PC, o qual foi inoculado com 2 alçadas de colônias em erlenmeyer, com posterior incubação em agitador orbital por 48 h a 30 °C.

O meio de cultivo foi composto por 50 mL de soro de leite e a adição de fontes de nitrogênio, indutor e micronutrientes estudados por Decesaro et al. (2020), o qual obteve a melhor condição com 0,5 g (1%) de sulfato de amônio, com adição de 0,25 mL da solução de micronutrientes e 1 mL (2%) de óleo de soja. A solução de micronutrientes foi composta por



Br: 0,026 g/L, Cu: 0,05 g/L, Mn: 0,05 g/L e Zn: 0,07 g/L, de acordo com Praveesh et al., 2011. Quando utilizado o soro de leite como meio de cultivo para a produção de biossurfactantes, o mesmo foi submetido a um pré-tratamento, através do ajuste do pH a 4,0 com HCl (1,0 mol/L) com posterior ebulição durante 10 min. Após arrefecimento, o precipitado foi removido por filtração através de algodão, o pH foi ajustado com NaOH (1,0 mol/L) para 7,0 e o sobrenadante autoclavado (Joshi et al., 2008). O pré-tratamento foi realizado com a finalidade de precipitar a proteína e hidrolisar a lactose, ficando mais disponível para os microrganismos.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo para realização da fermentação. A inoculação foi realizada com adição de 2 mL de inóculo preparado anteriormente, apresentando densidade ótica maior ou igual a 0,8 a 660 nm. Os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 30 °C durante 5 d, sendo retiradas alíquotas no tempo inicial, 2 d e 5 d para a determinação da tensão superficial do meio, realizada na ausência de células, após centrifugação das amostras a 5000 rpm por 20 min, em centrífuga Quimis®.

A tensão superficial foi usada como medida da produção de biossurfactantes, e foi determinada, para verificar a produção de biossurfactante através de fermentação submersa, com 15 mL de amostra conforme o método do anel Du-Nuoy's Ring, utilizando tensiômetro, marca Sigma, modelo 702.

Após o bioprocesso, o biossurfactante foi recuperado do meio livre de células de acordo com Dubey e Juwarkar (2001), sendo o caldo livre de células acidificado a pH 2 com HCl (1,0 mol/L), seguido por resfriamento durante 24 h a 4 °C e posterior centrifugação a 5000 rpm durante 10 min.

Posterior à precipitação do biossurfactante foi realizada a liofilização (liofilizador marca Terroni), através da desidratação das amostras a frio sob vácuo, com acondicionamento a -40 °C até o momento do uso. Os biossurfactantes liofilizados obtidos foram utilizados nos testes iniciais de padronização de metodologias para mensuração de biossurfactantes.

### **3.2.2 Desenvolvimento da metodologia para mensuração de biossurfactantes em meio aquoso**

Foram testadas metodologias de determinação da concentração de surfactina e raminolipídios através de método colorimétrico. As metodologias foram testadas para meio aquoso, pois o biossurfactante será extraído do solo em meio aquoso.

A surfactina foi mensurada em função da sua porção proteica, através de ligações peptídicas, determinada através do método de Biureto (Gornall et al., 1949). Estes procedimentos foram realizados para a surfactina produzida e pré-purificada em laboratório.

Em tubos de ensaio, em triplicata, foi adicionado 2,5 mL da amostra previamente diluída, adicionado de 2,5 mL do reagente de Biureto, com posterior agitação. Deixou-se em banho-maria por 15 min a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Para a realização do branco foi utilizado água destilada. A curva padrão foi estabelecida para concentrações de surfactina entre 10 a 500 mg/L.

O reagente de Biureto, de acordo com Gornall et al. (1949), foi composto por 1,5 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) dissolvido em 500 mL de água destilada. Adicionado, sob agitação constante, 300 mL de solução de NaOH 10%, e 1g de iodeto de potássio (KI), posteriormente o volume da solução foi completado para 1 L com água destilada.

Os raminolipídios foram mensurados devido à porção de açúcar, presente na ramnose monohidratada L ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) comercial, determinado através do método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956).

Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de amostra contendo ramnose, 1 mL da solução de fenol 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após, os tubos foram agitados em vortex e deixados em repouso por 10 min à temperatura ambiente, posteriormente os tubos foram resfriados em banho de água fria por 20 min, e realizada a leitura de transmitância a 490 nm em espectrofotômetro. Para a realização do branco foi utilizado água destilada. A curva padrão foi estabelecida para concentrações de ramnose entre 2 a 100 mg/L (Prieto, 2007).

Para avaliar a relação entre a concentração de biossurfactante e a redução da tensão superficial foi elaborada curva padrão, com a surfactina produzida no laboratório.

Foi preparada uma suspensão com o biossurfactante em uma concentração de 500 mg/L diluída em 1:1 de água destilada e álcool etílico 92,8%. A solução foi posteriormente agitada por 20 min em agitador magnético. Após, a suspensão foi sonicada por 10 min, com o intuito de acelerar a solubilização do biossurfactante.

A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas variando-se de 0,5 a 500 mg/L de biossurfactante, e foi realizada a medida da tensão superficial de cada solução (Alves, 2013). Assim foi obtida a curva padrão para o biossurfactante testado que relacionará a tensão superficial (mN/m) com a concentração (mg/L).

A metodologia referente a extração de biossurfactantes do solo foi executada utilizando-se como referência o estudo realizado por Martínez-Toledo e Rodríguez-Vázquez (2013). Os testes iniciais foram realizados com concentrações conhecidas (250 mg/kg, 1250 mg/kg e 2500 mg/kg) de surfactina produzida em laboratório, para se determinar a sensibilidade do método espectrofotométrico e cromatográfico para esta mensuração.

Os biossurfactantes foram diluídos em água, sendo que a quantidade de água adicionada foi de acordo com a umidade inicial do solo, com objetivo de se alcançar a umidade final de 34%. Após a diluição, a solução foi adicionada em 10 g solo estéril e os erlenmeyers foram deixados em repouso por 72 horas para ocorrer a interação do solo com o biossurfactante.

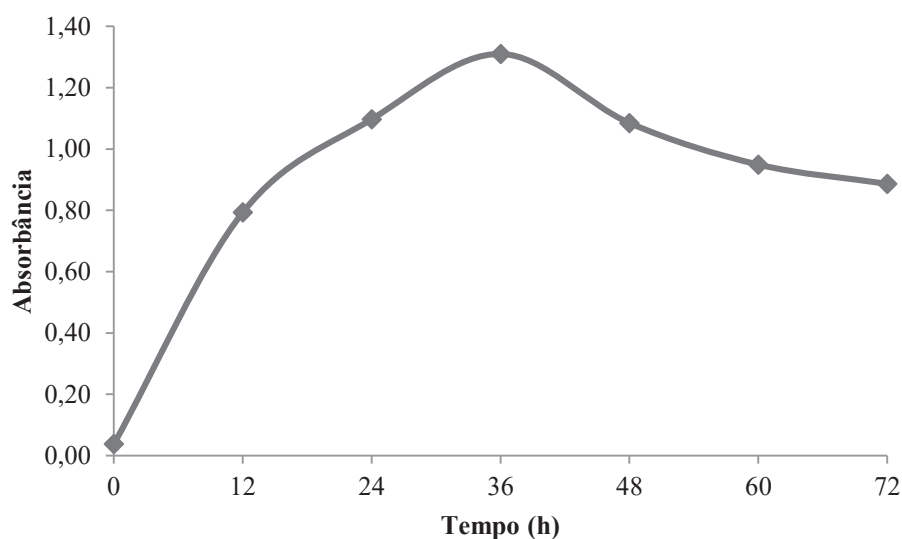
Os biossurfactantes foram extraídos através da adição de 100 mL de solvente (1:1 de água destilada e álcool etílico 92,8%) em 10 g, com posterior agitação a 150 rpm à 25 °C até o tempo correspondente a leitura de cada amostra. Após a amostra foi sonicada por 10 min com o objetivo de ocorrer uma melhor solubilização do biossurfactante no meio, na sequência foi realizada a filtração com acetato de celulose, com abertura de poro de 20 µm para retirada das partículas mais grosseiras do solo, e posteriormente foi realizada filtração com membrana de celulose com abertura de poro de 0,22 µm, com o intuito de deixar a solução límpida. O líquido resultante foi utilizado para avaliar e quantificar a presença de biossurfactante, através do método de Biureto e da leitura de tensão superficial, nos tempos 0, 3, 7 e 10 horas. Após a extração do biossurfactante do solo, foram determinadas as concentrações de surfactina de acordo com as metodologias padronizadas em meio aquoso.

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus methylotrophicus*

Inicialmente foi construída a curva de crescimento da bactéria *B. methylotrophicus* com o objetivo de verificação das fases de crescimento do microrganismo. A Figura 1 apresenta a curva de crescimento.

Figura 1: Curva de crescimento da bactéria *Bacillus methylotrophicus*.



Através da curva pode-se verificar que a fase de maior crescimento ocorreu até as 36 h, desse modo a inoculação do microrganismo no meio de cultivo foi realizada 24 h após o início da ativação.

Após foi realizada a caracterização do resíduo que foi utilizado no meio de cultivo para a produção de biossurfactantes, através de fermentação submersa com *Bacillus methylotrophicus*.

O soro de leite era composto por 92,20% de água, e o restante constituído por sólidos totais (6,54 g/100g), sendo proteína (1,16 g/100g), lactose (4,46 g/100g), gordura (0,21 g/100g), cinzas (0,09 g/100g), apresentando um pH de 5,11. Essa composição está muito próxima, a composição descrita por Andrade (2010), dita como típica.

Através dos resultados obtidos verificou-se que o soro de leite utilizado apresentou composição de soro de leite ácido (Spalatelu et al., 2012; Seguenka, 2016), com características semelhantes ao verificado por Decesaro et al. (2020), que também utilizou este resíduo para produção de surfactina. Os valores de pH estão diretamente relacionados com a contagem bacteriana total, devido a essas bactérias serem capazes de fermentar a lactose presente no leite, formando ácido lático, ocasionando a diminuição do pH (Nunes; Santos, 2015).

Como consequência da salinidade, o soro de leite ácido é mais difícil de ser processado e tem maiores custos de disposição do que o soro doce (Blaschek et al., 2007). O seu uso em alimentos é mais limitado, por causa do seu sabor ácido e alto teor de sais (Mawson, 1994). Devido a isso, a sua aplicação em processos fermentativos, como verificado por Decesaro et al. (2020), pode ser uma alternativa.

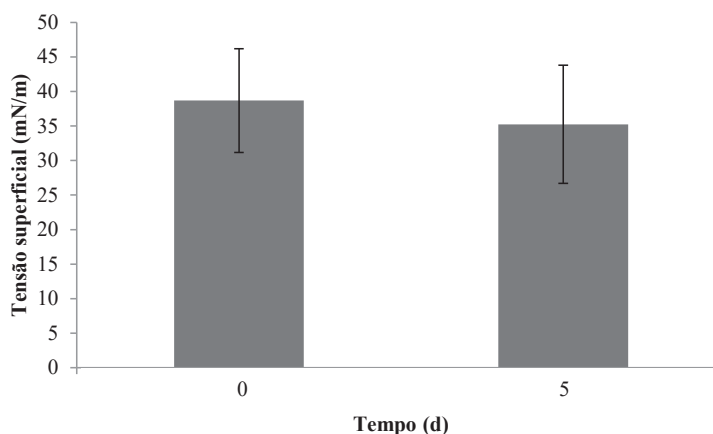
De acordo com Spalatelu (2012), o soro de leite, bem como a corrente de sais e lactose, pode ser utilizado em processos fermentativos de produção de bioprodutos com elevado valor agregado, tais como enzimas, compostos antimicrobianos, bioemulsificantes e proteína de origem unicelular (*single cell protein*), devido a sua composição rica em nutrientes. Porém, um obstáculo para a utilização do soro de leite é a grande quantidade de lactose presente, a qual contribui para sua baixa solubilidade (Seguenka, 2016). Entretanto, a lactose é um tipo de carboidrato muito utilizado como material energético em processos biotecnológicos.

No referido estudo, o soro de leite, para poder ser utilizado pelo *Bacillus methylotrophicus*, que não é uma bactéria láctica, passou previamente pelo pré-tratamento, o qual possibilitou o uso pelo microrganismo que não sintetiza a  $\beta$ -galactosidase (Domingues et al., 1999), pois precipitou a proteína e hidrolisou a lactose.

Desse modo, os processos biotecnológicos têm contribuído para o uso de resíduos gerados em processos agroindustriais. Estes resíduos constituem-se matérias-primas importantes para a composição de meios de cultivo em processos fermentativos, agregando valor a estes resíduos. Por outro lado, o uso destas matérias-primas em substituição aos compostos comumente utilizados nos bioprocessos como meios de cultivo, pode contribuir para a diminuição dos custos de produção (Muthusamy et al., 2008), tornando-os tecnologias mais acessíveis. Os bioprodutos, por sua vez, por serem obtidos através de vias naturais, encontram aplicação mais bem aceita que aqueles similares obtidos através de processos de síntese química.

Na Figura 2 são apresentados os resultados da tensão superficial obtida durante as duas bateladas da fermentação submersa com soro de leite utilizando o *Bacillus methylotrophicus*. Foram necessárias duas bateladas para a obtenção de surfactina suficiente para a elaboração da padronização das metodologias.

Figura 2: Tensão superficial obtida na produção de biossurfactantes durante as duas bateladas da fermentação submersa com *Bacillus methylotrophicus*.



Para a primeira batelada da fermentação submersa no tempo inicial obteve-se a tensão superficial de 43,98 mN/m, e após 5 dias de fermentação a tensão foi de 41,28 mN/m. Já para a segunda batelada de fermentação, a tensão superficial inicial foi de 33,38 mN/m e a tensão final de 29,19 mN/m, indicando a produção de biossurfactantes.

A divergência entre as tensões superficiais iniciais entre as bateladas pode ser devida as características do soro de leite utilizado. Mesmo sendo o soro proveniente da mesma coleta, a composição de nutrientes em cada bombona pode variar.

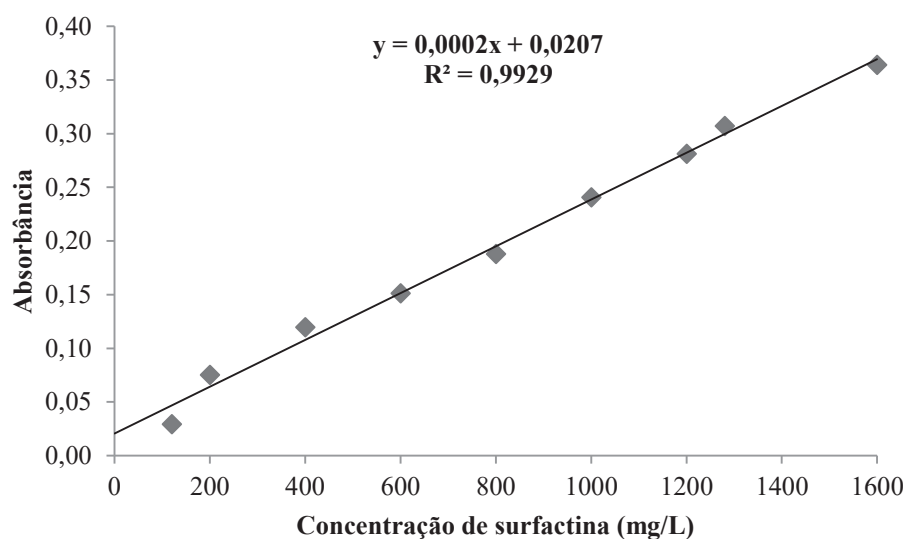
A redução da tensão superficial não foi muito acentuada, sendo de entorno de 8,90% (Figura 2), porém as duas bateladas da fermentação submersa resultaram em uma quantidade aproximada de 20,22 g de surfactina, sendo a quantidade de interesse para ser utilizada nas padronizações das metodologias.

Está em desenvolvimento a fermentação com o meio mineral para a bactéria *Bacillus methylotrophicus*, sendo posteriormente empregada também para *Pseudomonas aeruginosa*, para verificar a produção de biossurfactantes.

### 3.3.2 Padronização de metodologias para determinação de biossurfactantes em meio aquoso

Para a determinação da concentração de surfactina a partir do método de Biureto foram realizados dois testes, sendo elaborada duas curvas padrão. A Figura 3 apresenta a curva para o primeiro teste com concentrações que variaram de 120 a 1600 mg/L.

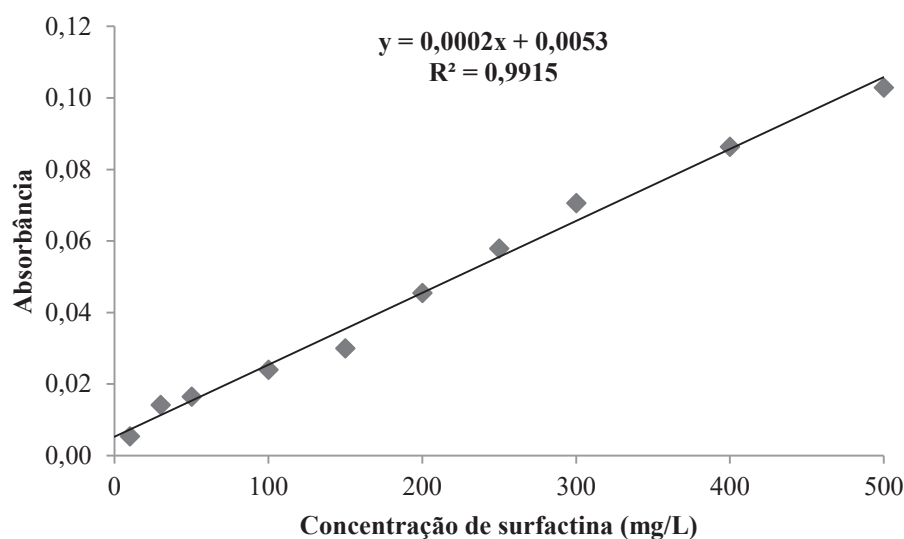
Figura 3: Curva padrão de surfactina para o primeiro teste.



Através da Figura 3, pode-se perceber que a curva padrão apresentou um valor de  $R^2$  de 0,9929, no entanto, estima-se que as concentrações de surfactina presentes no solo serão menores, como verificado por Martínez-Toledo e Rodríguez-Vázquez (2013). Além disso observou-se que a solução de Biureto, que fornece a coloração para a amostra, poderia ser aumentada, diminuindo a quantidade de amostra necessária para a realização das análises, devido a isso elaborou-se uma nova curva.

A curva padrão realizada no segundo teste (Figura 4) foi elaborada com concentrações inferiores (10 a 500 mg/L), e com adaptação na metodologia de Gornall et al. (1949), sendo utilizada a relação de 1:1 (amostra:solução de Biureto), com o objetivo de aumentar a coloração da amostra.

Figura 4: Curva padrão de surfactina para o segundo teste.



Considerou-se adequada a curva padrão do segundo teste para a surfactina (Figura 4). Caso a concentração de surfactina encontrada no solo seja superior a faixa de abrangência da curva, a solução contendo os biossurfactantes poderá ser diluída, para ajustar-se a curva.

O método de Biureto se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado por Gornall et al. (1949). O cobre, em meio alcalino, reage com as proteínas formando um complexo com a ligação peptídica, sendo a surfactina um peptídeo. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. Apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método (Zaia et al., 1998).

A intensidade da cor desenvolvida pela reação é proporcional à concentração de peptídios e por isso é possível fazer a determinação quantitativa através do método colorimétrico, pois indica as ligações peptídicas quando os íons de cobre em solução alcalina formam um complexo de coloração violeta.

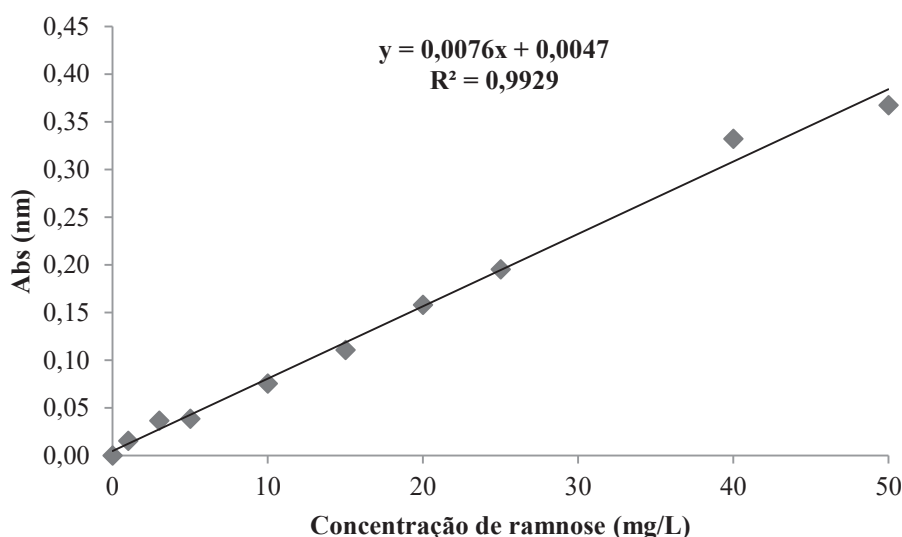
Através de pesquisas bibliográficas não se encontrou estudos onde foram utilizados métodos colorimétricos para a determinação da concentração de surfactina. Nos estudos desenvolvidos por Alves (2013), Silva (2013), Junior (2012) e Bugay (2009), a metodologia utilizada relacionou a concentração de biossurfactante com a redução da tensão superficial.



A surfactina utilizada para a elaboração da curva padrão foi produzida no laboratório, não sendo purificada, devido a isso se acredita que a concentração real do composto seja inferior, pois esta foi somente precipitada e liofilizada, o que não consiste um método de purificação que obtenha compostos de elevada pureza. Desse modo, será elaborada nova curva padrão para surfactina ( $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ ) padrão, com pureza  $\geq 98\%$ , para se ter maior precisão nos dados.

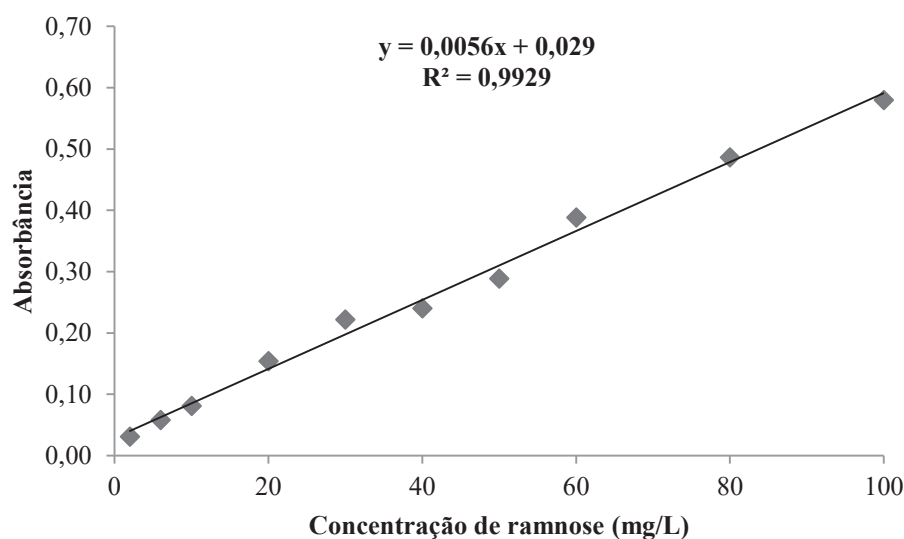
Para a determinação da concentração indireta de raminolipídios foram realizados alguns testes. No primeiro teste descrito foi elaborada uma curva padrão com concentrações que variaram de 1 a 50 mg/L (Figura 5), utilizando a metodologia de Dubois et al. (1956).

Figura 5: Curva padrão de ramnose para o primeiro teste.



Através da Figura 5 pode-se obter uma curva padrão satisfatória. No entanto, os valores de absorbância se encontravam próximos do extremo inferior, então com o intuito de ampliar a faixa de concentração, optou-se por refazer a curva com o dobro da concentração de ramnose (2 a 100 mg/L), apresentada na Figura 6.

Figura 6: Curva padrão de ramnose para o segundo teste.



A curva padrão apresentada na Figura 6 foi considerada apropriada para a realidade que se pode encontrar na solução contendo raminolipídios extraídos do solo.

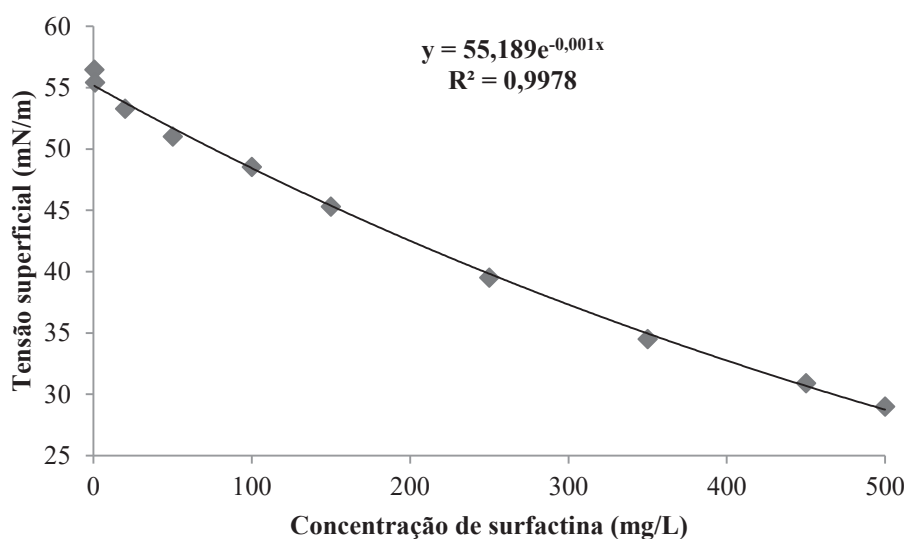
O método fenol sulfúrico de Dubois et al. (1956) utilizado para a determinação da ramnose, baseia-se na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A reação é sensível e de cor estável (Silva et al., 2003).

A ramnose utilizada para a elaboração da curva padrão foi a comercial que apresenta 99% de pureza, desta forma curvas semelhantes foram encontradas por outros autores (Pietro, 2007; Mano, 2008) utilizando a mesma metodologia.

Será elaborada, adicionalmente, a curva padrão com o biossurfactante raminolipídio, com pureza  $\geq 90\%$ .

Elaborou-se também a curva padrão para a surfactina a partir da relação entre a concentração de biossurfactante e a redução da tensão superficial, conforme elaborado por Alves, (2013); Silva, (2013); Junior, (2012) e Bugay, (2009), entre as concentrações de 10 a 400 mg/L (Figura 7).

Figura 7: Curva padrão para a surfactina relacionando a concentração com a redução da tensão superficial.



A curva padrão apresentada na Figura 7, foi considerada apropriada para a representação da surfactina extraída do solo. No entanto, quando comparada com outros estudos, pode-se verificar que a concentração utilizada é superior aos demais. Alves (2013), Silva (2013) e Mano (2008) utilizaram concentrações entre 1 e 25 mg/L. Isso se deve ao fato, de que a surfactina utilizada neste estudo não é purificada, e sim recuperada, justificando a necessidade de uma maior concentração.

O teste para mensuração do biossurfactante foi executado com o objetivo de avaliar a eficiência do método em recuperar o biocomposto do solo. Desta forma, foram adicionadas concentrações conhecidas de surfactina no solo (250 mg/kg, 1250 mg/kg e 2500 mg/kg) para verificar a eficiência do método em recuperar a quantidade adicionada.

Após a extração, a concentração de surfactina foi verificada através dos métodos padronizados em meio aquoso. Na Tabela 1 são apresentados os valores obtidos para a extração do biossurfactante em solo, através do método de Biureto.

Tabela 1: Mensuração do biossurfactante adicionado ao solo, através do método de Biureto.

Trat.	Tempo de extração (h)	Conc. de surfactina adicionada (mg/kg)	Conc. de surfactina (mg/L)	Conc. de surfactina (mg/kg)	Recuperação (%)
1	0		38,80	776,04	310,42
2	3	250	61,01	1220,26	488,11
3	7		134,01	2680,12	1072,05
4	10		66,11	1322,12	528,85
5	0		58,75	1175,07	94,01
6	3	1250	102,67	2053,39	164,27

7	7		141,32	2826,49	226,12
8	10		98,93	1978,55	158,28
9	0		106,71	2134,12	85,36
10	3	2500	106,42	2128,35	85,13
11	7		132,84	2656,74	106,27
12	10		83,17	1663,37	66,53

Através da Tabela 1 pode-se verificar que a recuperação foi superior a quantidade de biossurfactante adicionado. Acredita-se que isso se deve ao fato de que, podem estar sendo recuperados do solo outros componentes que não biossurfactantes, tais como células microbianas que podem estar causando interferência, não estando o método de extração adequado, necessitando de ajustes e ainda da aplicação da outra metodologia descrita no item 6.

Realizou-se também a mensuração através da tensão superficial, a qual está apresentada na Tabela 2

Tabela 2: Mensuração do biossurfactante adicionado ao solo, através da tensão superficial.

Trat.	Tempo (h) de extração	Concentração de surfactina adicionada(mg/kg)	Tensão superficial (mN/m)	Concentração de surfactina (mg/kg)	Recuperação (%)
1	0		29,84±0,017	6149,14	2459,66
2	3	250	30,06±0,015	6076,79	2430,72
3	7		29,57±0,017	6240,03	2496,01
4	10		30,06±0,025	6076,79	2430,72
5	0		30,04±0,056	6082,34	486,59
6	3	1250	28,31±0,072	6674,31	533,94
7	7		29,89±0,015	6133,51	490,68
8	10		30,14±0,010	6049,10	483,93
9	0		30,14±0,032	6050,21	242,01
10	3	2500	30,14±0,017	6049,10	241,96
11	7		29,91±0,015	6126,82	245,07
12	10		30,31±0,062	5992,86	239,71

Pode se observar, através dos dados obtidos que a recuperação também foi muito superior a concentração adicionada. Neste caso o erro pode estar relacionado ao uso de álcool etílico na extração do biossurfactante do solo, sendo que este componente faz com que a tensão superficial diminuía, dando um resultado falso quando relacionado com a concentração de surfactante.

Para posteriores estudos que envolvam a quantificação de biossurfactantes em extratos de solo, algumas técnicas de purificação e análise estão disponíveis para a sua caracterização estrutural e quantificação. Métodos analíticos cromatográficos e/ou espectrométricos de simples a sofisticados são empregados nesta caracterização, por exemplo, há a possibilidade de aplicação de métodos que envolvam cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa- espectrometria de massa (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida-espectrometria de massa (CL-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) (Varjani e Upasani, 2017; Alves, 2020).

### 3.4 Conclusão

A utilização do método de Biureto, não foi eficaz para a avaliação da produção de biossurfactantes no solo através da determinação da fração proteica da surfactina. A aplicação da curva padrão a partir da relação entre a concentração de biossurfactante e a redução da tensão superficial, apresentou resultados de porcentagem de recuperação acima do adicionado, isso pode ter ocorrido devido ao uso de álcool etílico na extração do biossurfactante do solo.

Desse modo, verificou-se que a produção de biossurfactante diretamente no solo é complexa de ser avaliada, e necessita de aprimoramentos no método de extração e na sua posterior quantificação.

### 3.5 References

- Alves, A.P.C., 2013. Concentração em coluna de bolhas e espuma de surfactina obtida a partir de *Bacillus* sp ITP - 001 isolado de solo contaminado por petróleo. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil
- Alves, M.F., 2020. Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis Vinífera* L.) para potencial aplicação na indústria de alimentos. Tese (Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos) – a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil
- Andrade, R.F.S., 2010. Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes *Candida lipolytica* e *C. Glabrata* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos. Dissertação (Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists, 2005. Official methods of analysis (OMA). In: Horwitz, W., Latimer, G. (Eds.), eighteenth ed. (Washington)
- Blaschek, K.M., Wendorff, W.L., Rankin, S.A., 2007. Survey of Salty and Sweet Whey Composition from Various Cheese Plants in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 90, 2029–2034. doi:10.3168/jds.2006-770

Bugay, C., 2009. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

Decesaro, A., Machado, T.S., Cappellaro, A.C., Reinehr, C.O., Thomé, A., Colla, L.M., 2017. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. *Environ. Sci. Pol. Res.* 24, 20831-20843. doi: 10.1007/s11356-017-9778-7

Decesaro, A., Machado, T.S., Cappellaro, A.C., Rempel, A., Margarites, A.C., Reinher, C.O., Eberlin, M.N., Zampieri, D., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Biosurfactants production using permeate from whey ultrafiltration and the bioproduct recovery by membrane separation process. *J. Surfact. Deterg.* 23, 539–551. doi:10.1002/jsde.12399

Decesaro, A., Rigon, M.R., Thomé, A., Colla, L.M., 2013. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *New Chem.* 36, 947-954 (in Portuguese). doi: 10.1590/S0100-40422013000700005

Domingues, L., Lima, N., Teixeira, J.A., 1999. Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo. IN Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, 6, Lisboa, 1999 - "Actas da 6.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente". Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 1999. vol. 3, p. 271-280

Dubey, K., Juwarkar, A., 2001. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J. Microb. Biot.* 17, 61-69. <https://doi.org/10.1023/A:1016606509385>

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28, 3, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017

Fontes, G.C., Amaral, P.F.F., Coelho, M.A.Z., 2008. Produção de biossurfactantes por levedura. *Quim. Nova*, 31, 2091-2099. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000800033>

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766

Instituto Adolfo Lutz, 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. In: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet (Coordenadores), 4 edição. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O., 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37, 1192-1201. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000400049>

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 99, 195–199. doi:10.1016/j.biortech.2006.12.010

Junior, G.A.L., 2012. Obtenção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

Karigar, C.S., Rao, S.S., 2011. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Res.* 7, 805187. <https://doi.org/10.4061/2011/805187>

- Kumar, V., Singh, S., Singh, A., Subhose, V., Prakash, O., 2019. Assessment of heavy metal ions, essential metal ions, and antioxidant properties of the most common herbal drugs in Indian Ayurvedic hospital: for ensuring quality assurance of certain Ayurvedic drugs. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18, 101018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.056>
- Mano, M.C.R., 2008. Estudo da recuperação, concentração e purificação de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil
- Martínez-Toledo, A., Rodríguez-Vázquez, R., 2013. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 595–605. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>
- Mawson, A.J., 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresour. Technol.* 47, 195–203. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90180-5)
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., 2008. Sivachidambaram, P., Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr. Sci.* 94, 736-747
- Nunes, L., Santos, M.G., 2015. Caracterização físico-química de soros obtidos de diferentes tipos de queijos. *Horizonte Científico*, 9, 1-18
- Praveesh, B.V., Soniyamby, A.R., Mariappan, C., Kavithakumari, P., Palaniswamy, M., Lalitha, S., 2011. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp from soil using whey as carbon source. *New York Science Journal.* 4, 99-103
- Prieto, L.M., 2007. Produção, caracterização parcial e aplicação ambiental de ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande, Brasil
- Sachdev, D.P., Cameotra, S.S., 2013. Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3, 1005-1016. doi: 10.1007/s00253-012-4641-8
- Saharan, B.S., Sahu, R.K., Sharma, D., 2011. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genet. Eng. Biotechnol. J.* 1, 1-14
- Seguenka, B., 2016. Produção de concentrado proteico e lactose de soro de leite por processos de separação por membranas. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil
- Sidhu, G.K., Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D.S., Datta, S., Singh, J., 2019. Toxicity, monitoring and biodegradation of organophosphate pesticides: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49, 1135-1187. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1565554>
- Silva, M.T.S., 2013. Produção e concentração integrada de surfactina a partir de *Bacillus* sp ITP-001 em fracionamento com espuma em semi-batelada. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil
- Silva, R.N., Monteiro, V.N., Alcanfor, J.D'A.X., Assis, E.M., Asquieri, E.R., 2003. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3, 337-341
- Singh, S., Kumar V., Singh, S., Dhanjal, D.S., Datta, S., Sharma, D., Singh, N. H., Singh, J., 2020. 16 - Biosurfactant-based bioremediation. Editor(s): Vimal Chandra Pandey, Vijai Singh, *Bioremediation of Pollutants*, Elsevier, 333-358, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00016-8>

Spalatelu, C., 2012. Biotechnological valorization of whey. *Innov. Rom. Food Biotechnol.* 10, 1-8.

Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 232, 389–397. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.047

Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., Yu, H., 2018. Petroleum hydrocarbon degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Front. Microbiol.* 9, 2885. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885

Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J., 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim. Nova*, 21, 787-793



## 4 CAPITULO III: Application of two bacterial surfactants in clayey soil: effects on diesel oil sorption<sup>2</sup>

### Abstract

This study investigated the retention of diesel in clay soil during biostimulation by bacterial biosurfactants (surfactin or rhamnolipid) with different rainfall volumes. Several experiments were conducted in the laboratory with various moisture contents (15%, 25%, and 35%) and biosurfactant concentrations (0%, 0.25%, and 0.5%). The volume of diesel oil, equivalent to the void volume of the soil, was placed on top of the soil and allowed to percolate for 20 days. After this period, the specimens were subjected to different rainfall conditions (0 mm, 15 mm, and 30 mm) and monitored for another 20 days. The highest retention of diesel oil occurred with the soil presenting 15% moisture, without rainfall, and with a 0% biosurfactant concentration; the retention rates were 130.33 g/kg in the presence of surfactin and 130.97 g/kg in the presence of rhamnolipid. Statistical evaluation revealed that moisture content and rainfall were the factors that most influenced the retention of diesel oil in the soil. The surfactin or rhamnolipid concentration did not have an effect; that is, regardless of the amount of biosurfactant added to the soil, there was no variation regarding the residual contaminant content. Thus, it can be said that the insertion of surfactin or rhamnolipid in sufficient quantity for effective bioremediation does not affect the percolation of the contaminant in the soil.

**Keywords:** contaminant retention, diesel oil, rhamnolipid, surfactin,

### 4.1 Introduction

Globally, oil is the most consumed fossil fuel compared with other energy sources, such as coal and natural gas (Karthick et al., 2019). Generally, crude oil products are transported from exploration and extraction sites to refineries and fractional refinery products to the point of distribution through trucks, railways, pipelines, and ships. The main sources of oil contamination in soil are leaks in fuel storage systems, cargo transportation accidents, and improper management of oil waste disposal (Almansoori et al., 2015; Hu et al., 2014).

Accidental spills lead to degradation of natural ecosystems and favor the accumulation of hydrocarbons in living organisms. Hydrocarbon contaminants are known to belong to the

---

<sup>2</sup>Ângela Carolina Cappellaro, Bruna Strieder Machado, Iziqiel Cecchin, Antônio Thomé, Luciane Maria Colla

family of hazardous pollutants due to their toxicity, mutagenicity and carcinogenicity (Abdollahinejad et al., 2020). Chronic hydrocarbon exposure is known to cause serious health problems, including allergy, skin disease, heart disease, and endocrine disorders (Cheng et al., 2017; Zeng et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Transport of contaminants—and consequently, the size of the area affected by a spill—may be influenced by other factors, such as the amount and type of fuel released, soil type, particle size distribution, and organic content. Such elements will determine the level of retention and ground fuel attenuation. Such factors also influence the release and subsequent migration of oily compounds to the subterranean region (Ortega-Calvo et al., 2013). Therefore, it is essential to implement remediation techniques at these sites to reduce contaminant concentrations to levels acceptable for maintaining the ecological balance (Nwankwegu and Onwosi, 2017). One of the techniques that has been widely studied is bioremediation (Abdollahinejad et al., 2020; Chen et al., 2020; Khayati and Barati, 2017; Silva-Castro et al., 2012), which consists of using the metabolic potential of microorganisms to biodegrade the contaminant (Gaylard et al., 2005).

The degradation of the contaminant in the soil occurs naturally because of microbial activity, with the production of biosurfactants, mainly surfactin (peptide linked to the carboxyl and hydrocarboxyl groups of long-chain fatty acids) and rhamnolipids (glycolipid consisting of carbohydrates linked to long chains of fatty acids associated with molecules of rhamnose). *Pseudomonas* and *Bacillus* species are easily found in soils, and they have been proven to be involved in the degradation of petroleum compounds (Ali et al., 2012; Ma et al., 2016; Mnif et al., 2015; Pacwa-Plociniczak et al., 2014).

In addition to the production of naturally occurring microbial surfactants, it is possible to add biosurfactants as a way to accelerate the biodegradation process (Dai et al., 2020; Decesaro et al., 2016; Kreling et al., 2020; Mnif et al., 2015). The addition of biosurfactants has beneficial effects regarding increased hydrocarbon bioavailability and access to degrading microorganisms (Pantsyrnaya et al., 2011) for use as a nutrient source, but it may have other consequences not yet measured in relation to soil mobility of the contaminant (Baptista, 2007). Some researchers have found that contaminant desorption may occur in the soil (Lawniczak et al., 2013), causing negative effects on biodegradation (Onur, 2015); this desorption may also be related to environmental factors, such as precipitation (Balseiro-Romero et al., 2018; Thomé et al., 2017).

According to a study conducted by Thomé et al. (2017), a nutrient insertion (NPK) in its mineral form affects the soil's ability to interact with organic contaminants because the

nutrients have a positive charge and are hydrophilic, which causes the preference for reactions in the active sites of clays. This effect is associated with the selectivity presented by the clay minerals to the loads presented in the nutrients, as well as by their hydrophilic behavior. The authors found that the use of mineral nutrients to promote bioremediation in soils contaminated with petroleum derivatives can increase the mobility of these contaminants in the soil. However, studies that address the effect of nutrients in the organic form in the desorption of contaminants have not yet been developed. Likewise, there are no studies that show the influence of the addition of biosurfactants on the processes of oil contaminant mobilization in clayey soils. This study aimed to evaluate whether the addition of biosurfactants (surfactin and rhamnolipids) influenced the adsorption process of diesel oil-B10 in clay soil with different precipitation volumes.

## 4.2 Material and methods

### 4.2.1 Soil

The soil is pedologically classified as Humic Dystrophic Red Latosol (Streck et al., 2008) and geotechnically as high plasticity clay (CH) by the Unified Soil Classification System (ASTM International, 2011). It has acidic pH, low organic matter content, high clay content, and low cation exchange capacity (CEC) (Streck et al., 2008). The soil showed high permeability, due to its high porosity and void rate, typical of residual clay soil (Thomé et al., 2014). The soil was collected at the University of Passo Fundo (geotechnical experimental campus) in a deformed state at a depth of 1.2 m. Table 1 shows the geotechnical and physical characteristics of the soil.

Table 1 - Characteristics of the soil used in the experiment.

<b>Parameter (units)</b>	<b>Value</b>
Clay (%)	68.0
Silt (%)	5.0
Fine sand (%)	27.0
Liquid limit (%)	53.0
Plastic limit (%)	42.0
Specific gravity of solids	2.67
Field moisture content (%)	34.0
Field unit weight (kN/m <sup>3</sup> )	16.3
Void ratio	1.2

Degree of saturation (%)	75.7
Porosity (%)	54.0
pH	5.4
Organic content (%)	0.5
Cation exchange capacity (CEC) (cmolc/dm <sup>3</sup> )	8.6
Hydraulic conductivity (m/s)	$1.39 \times 10^{-5}$

---

#### 4.2.2 Contaminant

The diesel oil used as a contaminant was supplied by the Brazilian Petroleum Company (Petrobras), composed of a mixture, 90% of which is diesel oil and 10% of biodiesel. The largest fraction referring to diesel oil, consists of a complex mixture, derived from the refining process of crude oil via fractional distillation, that is composed primarily of saturated or aromatic hydrocarbons with a carbon chain comprising 9 to 30 carbon atoms. Its main characteristics are as follows: melting point/freezing point: -40 to 6 °C; initial boiling point and boiling temperature range: 150–471 °C; flash point: 38 °C; lower/upper limit of flammability or explosiveness: 1.0 to 6.0%; vapor pressure: 0.4 kPa at 40 °C; relative density: 0.815–0.853 at 20 °C; solubility: insoluble in water, soluble in organic solvents; octanol/water partition coefficient: log Kow: 7.22; auto-ignition temperature:  $\geq 225$  °C; decomposition temperature: 400 °C; viscosity: 2.0–4.5 cSt at 40 °C; distillation range: 100–400 °C at 760 mmHg; and electrical conductivity: 25 pS/m (Petrobras, 2018).

The volume of contaminant inserted was determined according to the specimen porosity, calculated according to Equation 1.

$$\eta = \frac{e}{1+e} \times 100 \quad (1)$$

where

$\eta$ : soil porosity (%);

$e$ : void ratio;

Considering a void index of 1.24, the porosity is equal to 55.36%, and the total specimen volume is 335.58 cm<sup>3</sup>. The volume of diesel oil used to saturate the specimen was 185.8 mL or 154.10 g. If the entire volume of diesel oil remained in the soil, it would result in a concentration of 396.2 g of contaminant/kg of soil.

### 4.2.3 Biosurfactants

The surfactin used was produced by submerged fermentation, using the bacterium *Bacillus methylotrophicus* that was previously isolated and identified by Decesaro et al. (2013) and used for biosurfactant production by Decesaro et al. (2020). The fermentation process had pretreated whey as a substrate, supplemented with 1% ammonium sulfate as a nitrogen source and the addition of 0.5% of a micronutrient solution (NaBr: 0.033 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O: 0.20 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.81 g/L, and ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.31 g/L; adapted from Praveesh et al., 2011) and 2% soybean oil as an inducer. After the fermentation process, surfactin was recovered by precipitation and lyophilized to give crude biosurfactant for later use. This biosurfactant produced under the conditions was characterized as lipopeptide isoforms and identified as surfactin by Decesaro et al. (2020). Surfactin is a cyclic peptide of seven  $\alpha$ -amino acids linked to a  $\beta$ -hydroxy fatty acid chain with variable length, 12 to 16 carbon atoms, forming a cyclic lipopeptide; its primary structure was determined by Kakinuma et al. (1969).

The commercial rhamnolipid biosurfactant (R90, 90% purity) used in this study was purchased from Sigma-Aldrich, a product supplied by AGAE Technologies LLC (Oregon, USA), with a 90% purity standard, in solid/granular form. Rhamnolipid biosurfactants are glycolipids containing L-rhamnose and  $\beta$ -hydroxyl fatty acids, with amphiphilic (hydrophilic and hydrophobic) properties. This rhamnolipid was produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and subsequently purified, containing a mixture of rhamnolipids with fatty acids of variable tail length (AGAE Technologies, 2017).

### 4.2.4 Experimental design

In bioremediation strategies, it is important to consider the influence of physicochemical factors on soil contaminant retention. The aim of this study was the investigation of soil diesel oil retention, which was measured in specimens under laboratory conditions. Soil type (clay), void index (1.24), and soil particle contact time with diesel oil (40 d) were set as variables. The control variables were as follows:

- Gravimetric moisture content of the soil (15%, 25%, and 35%). The content values were based on a previous study by Thomé et al. (2017);

- The addition of biosurfactants—surfactin or rhamnolipid (0%, 0.25%, and 0.5%). The definitions of concentrations were based on the study by Decesaro (2016), who verified

that the addition of the biosurfactant at 0.5% in bioremediation increased the removal of oily contaminant by about 40% compared with natural attenuation;

- Rainfall volume (0 mm, 15 mm, and 30 mm). These volumes were determined to simulate the rainfall that commonly occurs in the region where the study was developed.

Table 2 presents the coded and real levels of the variables of the central composite design  $2^3$  with 4 central points, used to evaluate the effect of the variables on soil contaminant sorption, totaling 12 experiments for each biosurfactant (surfactin or rhamnolipid).

Table 2 - Central composite design  $2^3$  with 4 central points to evaluate the action of biosurfactant (surfactin or rhamnolipid) on the sorption of the diesel oil.

Experiment	Moisture content (%)	Conc. of biosurfactant in relation to the contaminant (%)	Rainfall (mm)
1	15 (-1)	0.0 (-1)	0 (-1)
2	35 (+1)	0.0 (-1)	0 (-1)
3	15 (-1)	0.5 (+1)	0 (-1)
4	35 (+1)	0.5 (+1)	0 (-1)
5	15 (-1)	0.0 (-1)	30 (+1)
6	35 (+1)	0.0 (-1)	30 (+1)
7	15 (-1)	0.5 (+1)	30 (+1)
8	35 (+1)	0.5 (+1)	30 (+1)
9	25 (0)	0.25 (0)	15 (0)
10	25 (0)	0.25 (0)	15 (0)
11	25 (0)	0.25 (0)	15 (0)
12	25 (0)	0.25 (0)	15 (0)

The amount of diesel oil retained in the soil was the response variable - based on the mass of contaminant extracted from the soil - through the 3550C method (USEPA, 2007), including soil/contaminant interactions and contaminant leaching due to varying rainfall volumes.

#### 4.2.5 Specimen molding and rainfall simulation

Initially, the soil was dried and sieved through sieve number 10 (2.0 mm) to avoid clods and make it homogeneous. In molding the specimens, a constant weight of 400 g of dry soil was used to ensure that each sample had the same surface area specific to the physicochemical reactions, making the experiment more representative. The soil was mixed with distilled water to reach the initial moisture content (15%, 25%, and 35%) before being

compacted into a PVC mold (67.5-mm internal diameter and 200-mm height) using a hand press (Fig. 1). When applied, the biosurfactants were added to the water used for conditioning moisture to obtain the desired initial moisture content for each sample.

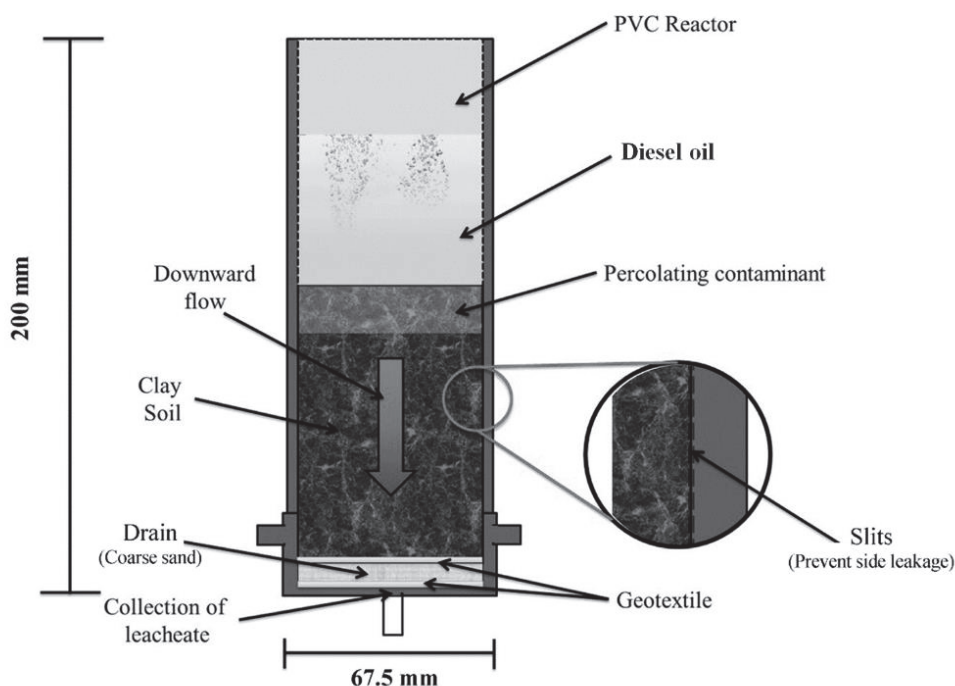
The unstructured soil with humidity adjusted to the values determined by the experimental design was compacted in four layers of 100 g to obtain greater homogeneity of compaction. The void index was controlled through the height of each layer, with the area of the PVC pipe and soil mass constant; in this way, the sample density, and consequently, its void ratio (1.24) were obtained. After the molding of the specimens, the samples did not undergo modifications that could alter their dry density or void ratio, as they were only submitted to the contaminant spill simulation and rain simulation (without direct impacts).

The amount of diesel oil added to the specimens was equivalent to the void volume. The volumes of diesel were spilled on the soil surface, causing the saturation of the specimens, and part of the contaminant became retained in the porous soil and the remainder percolated through the soil until the collection system was inserted into the bottom of the perforated closing cap. To avoid preferential flow, grooves were created in the inner surface of the PVC pipe and to prevent contamination by the external environment, the upper part of the PVC pipe was wrapped with a protective plastic film.

The saturation of soil samples is a fundamental parameter for understanding the dynamics of contaminants in the soil. This control variable was established to assess the effects of the contaminant's hydrophobicity against different contamination scenarios (periods of rain and drought). However, in the experimental evaluation, the effects with their peers were considered, that is, samples with the same moisture content and the presence or absence of nutrients and simulation or lack of simulation of precipitation. This analysis allows the sensitivity of the effects of each element in the experiment to be established, indicating whether, in periods of drought (low soil moisture) or rain (higher humidity), we would have greater or lesser retentions of the contaminant in the soil.

The experiment was conducted to evaluate only the reactions between the soil and its components, so that the physicochemical interactions of the contaminant with the soil matrix could be evaluated without the influence of biodegradation. In this way, the soil, water, or biosurfactant solution used for moisture correction were sterilized for 20 min at 121 °C and 110 kN/m<sup>2</sup> of autoclave pressure.

Figure 1: Schematic model of specimen mounting.



Rainfall simulation was started after diesel oil percolation in the soil for 20 days. Rainfall was simulated by pouring water on the surface of the specimens. The volume of water added was equivalent to 15 mm and 30 mm of rainfall below the surface, corresponding to 52.4 mL and 104.8 mL, respectively. The water percolated the specimen, interacted with the diesel oil in the free phase or adsorbed on the surface of the particles, and was collected through the system installed at the bottom. Within 40 days after the beginning of the contamination, the specimens were exhumed, samples were collected from each experimental unit, and quantitative analyses of the residual content of diesel oil were performed.

#### 4.2.6 Analytical methods

For the determination of the content of diesel oil retained in the soil, oil and grease analysis was performed, where the soil was homogenized and 10 g samples were collected in triplicate for each specimen, and the contaminant was extracted through ultrasound probe according to method 3550C (USEPA, 2007). The residual content calculation was calculated according to Equation 2. The amount of residual contaminant in the soil was equal to the contaminant extracted using this procedure.



$$RC (g/kg) = \frac{(B_W + C) - B_W}{D_w} \cdot 100 \quad (2)$$

where:

RC: Residual content of contaminant in the soil sample (g/kg);

D<sub>w</sub>: Dry weight of the soil used for the analysis (g);

B<sub>w</sub>: Empty weight of the beaker (g);

B<sub>w</sub> + C: Weight of beaker and contaminant extracted from the soil (g);

#### 4.2.7 Statistical analysis of data

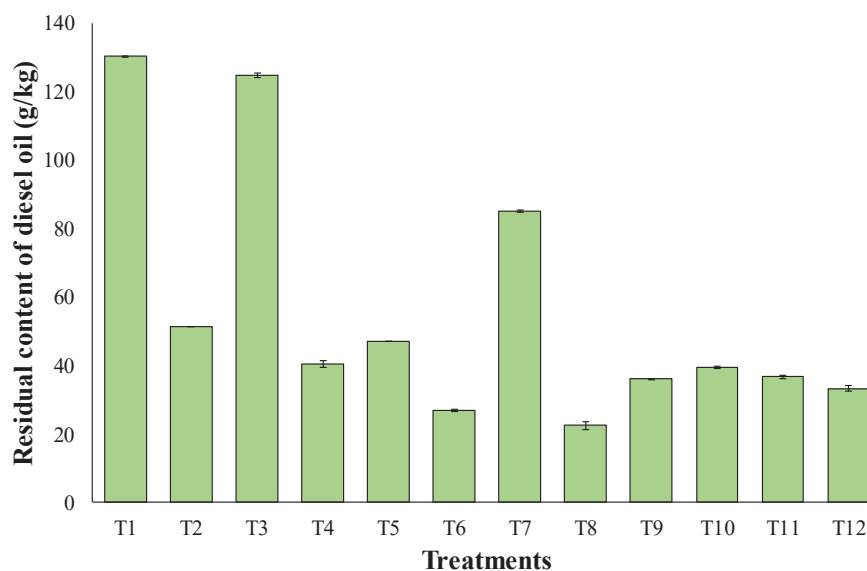
The data treatment was performed using analysis of variance (ANOVA) with a 95% confidence level ( $p < 0.05$ ) via Statistica 5.5 (Statsoft, 1999) software.

### 4.3 Results and discussion

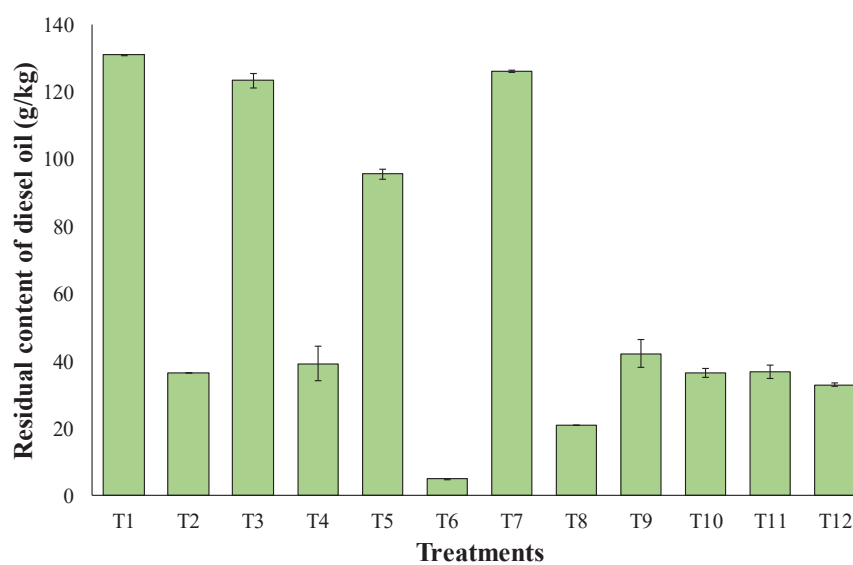
Figure 2 shows the residual soil diesel oil content for all experiments after 40 days, with Figure 2a referring to the surfactin treatment and Figure 2b to the rhamnolipid treatment. Table 3 presents the analysis of variance and Table 4 the effect estimates and regression coefficient of the influence of experimental design variables on residual diesel oil content in the experiments.

Figure 2: Residual content of diesel oil in soil (g/kg) after 40 days in the presence of surfactin (a) and rhamnolipid (b).

(a)



(b)



**Treat. 1:** Moisture content, 15%; surfactin or rhamnolipid, 0%; rainfall, 0 mm; **Treat. 2:** moisture content, 35%; surfactin or rhamnolipid, 0%; rainfall, 0 mm; **Treat. 3:** moisture content, 15%; surfactin or rhamnolipid, 0.5%; rainfall, 0 mm; **Treat. 4:** moisture content, 35%; surfactin or rhamnolipid, 0.5%; rainfall, 0 mm; **Treat. 5:** moisture content, 15%; surfactin or rhamnolipid, 0%; rainfall, 30 mm; **Treat. 6:** moisture content, 35%; surfactin or rhamnolipid, 0%; rainfall, 30 mm; **Treat. 7:** moisture content, 15%; surfactin or rhamnolipid, 0.5%; rainfall, 30 mm; **Treat. 8:** moisture content, 35%; surfactin or rhamnolipid, 0.5%; rainfall, 30 mm; **Treat. 9–12:** moisture content, 25%; surfactin or rhamnolipid, 0.25%; rainfall, 15 mm. Note: Equal letters in the same column indicate no statistical difference at the 95% confidence level.

As can be seen in Figure 2, the moisture content of the specimens and the precipitation volume caused variability in the residual contaminant content present in the soil. The specimen that presented the highest residual diesel oil content in its structure was that of experiment 1 (moisture of 15%, 0 mm of precipitation, and 0% biosurfactant concentration), with 130.33 g/kg in the presence of surfactin and 130.97 g/kg in the presence of rhamnolipid

According to the results of the ANOVA, the moisture content significantly influenced the residual soil diesel oil content in the experiments with surfactin ( $p < 0.001$ ) or rhamnolipid ( $p < 0.001$ ). The effect of moisture was negative (-61.65 for surfactin and -93.64 for rhamnolipid), and it was observed that there was a higher retention of residual oil in the specimens with lower initial moisture (15%). The non-occurrence of this factor was also observed in specimens of the same configuration, but with a moisture content of 35%. This effect is associated with hydrophobicity factors existing between the diesel oil and the water present in the specimen (Cui et al., 2003), which makes the interactions between soil particles and diesel oil less intense, resulting in less retention in the environment (Chiou, 2002; Ortega-Calvo et al., 1997). The lower the moisture content, the greater the amount of residual diesel oil. According to Guiguer (2000), hydrocarbon adsorption in soil materials increases with the decline in moisture. These findings are associated with the effects of hydrophobicity between organic contaminants and water present in the soil structure, indicating that higher or lower moisture content provides different results in the retention of hydrophobic contaminants in the soil (Schlosser, 2017). Low moisture results in low saturation of the medium, causing the contaminant to remain adsorbed to the soil.

Regarding the experiments submitted to the rainfall simulation (experiments 5, 6, 7, and 8), it was verified that there was a difference in the residual content of diesel oil in the specimens, and the higher the precipitation volume, the lower the volume residual contaminant content, indicating that the presence of precipitation increases the leaching of the soil matrix contaminant. Such an effect can be attributed to the fact that the clay minerals and iron oxides that make up the study soil are more susceptible to interactions with inorganic and/or polar substances (Thomé et al., 2017). The estimated effects of rainfall also had significant effects at the 90% confidence level ( $p < 0.001$  for surfactin assays and  $p = 0.056$  for rhamnolipid assays) under the response variable in the experiment; this main effect was also negative (-41.39 for surfactin and -20.65 for rhamnolipid), meaning that a lower rainfall level was associated with a higher residual diesel oil content. Thus, these results are associated with the leaching effects that the rainfall variable provided in the experiment, resulting in decreases in the initial contamination values.

Table 3 - Analysis of variance (ANOVA) of the influence of experimental design variables on residual diesel oil content in the experiments, in the presence of surfactin and rhamnolipid.

	<b>Sum of squares</b>	<b>Degrees of freedom</b>	<b>Means square</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Surfactin</b>					
Moisture content (%)	15 203.43	1	15 203.43	50.64	$p < 0.001$
[Surfactin] (%)	73.36	1	73.36	0.24	0.63
Rainfall (mm)	6853.02	1	6853.02	22.82	$p < 0.001$
Moisture content (%) by [surfactin] (%)	583.36	1	583.36	1.94	0.18
Moisture content (%) by rainfall (mm)	1621.36	1	1621.36	5.40	$p < 0.05$
[Surfactin] (%) by Rainfall (mm)	629.35	1	629.35	2.096	0.16
Error	5104.16	17	300.24		
Total sum of squares	30068.04	23			
<b>Rhamnolipid</b>					
Moisture content (%)	35 075.59	1	35 075.59	86.7098 8	$p < 0.001$
[Rhamnolipid] (%)	432.90	1	432.90	1.07017	0.31
Rainfall (mm)	1705.50	1	1705.50	4.21614	0.056
Moisture content (%) by [rhamnolipid] (%)	5.00	1	5.00	0.01237	0.91
Moisture content (%) by rainfall (mm)	73.79	1	73.79	0.18242	0.67
[Rhamnolipid] (%) by Rainfall (mm)	654.17	1	654.17	1.61717	0.22
Error	6876.78	17	404.52		
Total sum of squares	44823.74	23			

As can be observed, the biosurfactant concentration (surfactin or rhamnolipid) did not present significant effects on the residual diesel oil content. Regardless of the amount of biosurfactant added to the soil, there was no variation regarding the residual contaminant content; that is, a higher concentration of surfactin or rhamnolipid did not cause variation in contaminant leaching. This finding can be positively evaluated, because it means that there will be no carryover of the contaminant to deeper soil areas in the application of this biosurfactant at a concentration of 0.5% in the field, and as verified by Decesaro (2016) in a

previous study, this concentration of surfactin in bioremediation assays increases the contaminant biodegradation rate.

Table 4 - Effect estimates and regression coefficient of the influence of experimental design variables on residual diesel oil content in the experiments, in the presence of surfactin and rhamnolipid.

	<b>Effect estimates</b>	<b>Regression coefficient</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Surfactin</b>			
Media	56.12	56.12	$p < 0.001$
Moisture content (%)	-61.65	-30.82	$p < 0.001$
[Surfactin] (%)	4.28	2.14	0.63
Rainfall (mm)	-41.39	-20.69	$p < 0.001$
Moisture content (%) by [surfactin] (%)	-12.08	-6.038	0.18
Moisture content (%) by rainfall (mm)	20.13	10.07	0.033
[Surfactin] (%) by rainfall (mm)	12.54	6.27	0.16
<b>Rhamnolipid</b>			
Media	60.52	60.52	$p < 0.001$
Moisture content (%)	-93.64	-46.82	$p < 0.001$
[Rhamnolipid] (%)	10.40	5.20	0.31
Rainfall (mm)	-20.65	-10.32	0.056
Moisture content (%) by [rhamnolipid] (%)	-1.12	-0.56	0.91
Moisture content (%) by rainfall (mm)	-4.29	-2.15	0.67
[Rhamnolipid] (%) by rainfall (mm)	12.79	6.39	0.22

The increase in the rate of biodegradation in situ, in the presence of rhamnolipids, was also verified by Martínez-Toledo and Rodríguez-Vázquez (2013), who evaluated the production of rhamnolipids in soil contaminated with hydrocarbons. The production of biosurfactant was around 2 mg/kg. This concentration, which is much lower than that of the present study, caused increased decontamination of the soil by total oil hydrocarbons compared with the control experiment.

The correlation coefficient ( $R^2$ ) obtained for the adjusted models was higher than 0.80 (0.83 for surfactin and 0.84 for rhamnolipid), which means that the percentage of variation explained by the model was greater than 80%. According to Barros Neto et al. (2001), in

analysis the variance of a model, a part of the total variation of the observations around the mean is described by the regression equation, while the rest is part of the residuals; the larger the fraction described by the regression—or better, how much the closer to 1 the value of  $R^2$  is—the better the model will fit the observed data.

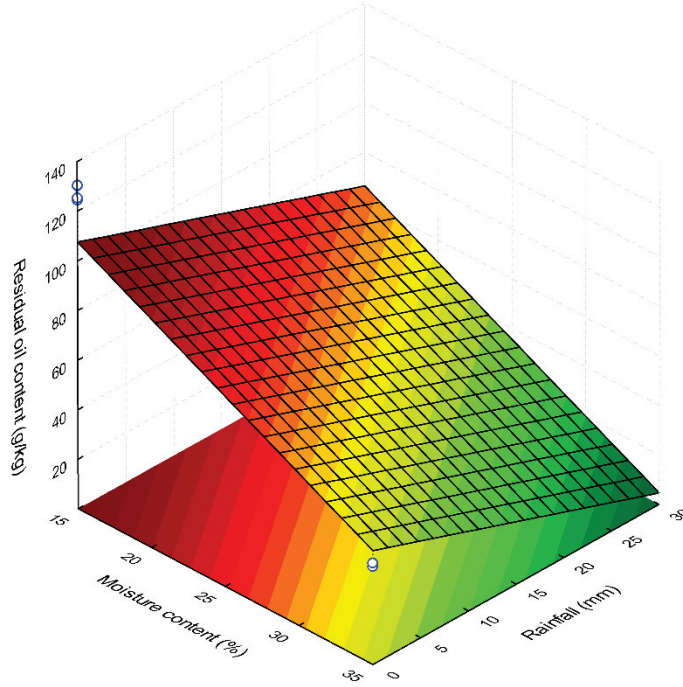
It was found that the models showed regression and a lack of significant adjustment at 5% probability; however, according to Box and Wetz (1973) and Bruns et al. (2006), for a regression to be considered predictive, the  $F$  calculated value must be at least 4 to 5 times the  $F$  tabulated value. In our study, the  $F$  calculated value in relation to the  $F$  tabulated for surfactin was 6.63 times higher, and for rhamnolipid, it was 7.48 times higher (Table 5), indicating the validation of the statistical model and the response surfaces (Figure 3).

Table 5 - Effect estimates and regression coefficient of the influence of experimental design variables on residual diesel oil content in the experiments, in the presence of surfactin and rhamnolipid.

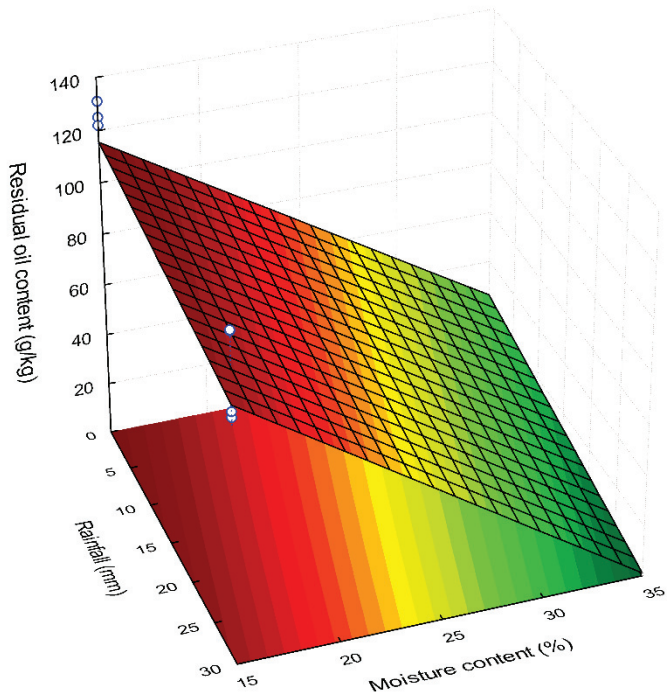
	<b>Sum of squares</b>	<b>Degrees of freedom</b>	<b>Means Square</b>	<b><math>F</math> calculated</b>	<b><math>F</math> tabulated</b>	<b><math>F</math> calculated/ <math>F</math> tabulated</b>
<b>Surfactin</b>						
Model	24963.88	6	4160.65	13.86	2.091	6.63
Error	5104.16	17	300.24			
Total sum of squares	30068.04	23				
<b>Rhamnolipid</b>						
Model	37946.96	6	6324.49	15.63	2.091	7.48
Error	6876.78	17	404.52			
Total sum of squares	44823.74	23				

Figure 3: Response surface of residual content of diesel oil in soil (g/kg) after 40 days in the presence of surfactin (a) and rhamnolipid (b).

(a)



(b)



Figures 3a and 3b show what has already been evidenced previously, making it clear for both surfactin and rhamnolipid that the greater the volume of precipitation and the greater the moisture content are, the lower the residual content of contaminant present in the soil becomes. The effect of increased moisture content and precipitation provides greater difficulty in adsorbing organic contaminants in the soil due to their interactions. Considering a field intervention, this factor would cause the contamination plume to increase, making the area's remediation process more difficult. However, the addition of biosurfactants was not a significant factor and did not interfere with the final concentration of the contaminant present in the soil.

This study presented different results to what was verified by Thomé et al. (2017), who found that the presence of nutrients in the soil caused a difference in the residual contaminant content; according to the study, this is due to a saturation of the active field of clay minerals and/or mineral particles capable of performing cation exchange, reducing the natural attenuation capacity of soils, because of its selectivity by inorganic compounds for load balancing. This occurred because the biosurfactants were inserted in concentrations lower than those applied by Thomé et al. (2017), as the positive effect of oily contaminants on biodegradation has already been verified in previous studies at these concentrations.

#### **4.4 Conclusions**

The factors that most influenced the result of oil retention in the soil were moisture content and rainfall. The lower the moisture content, the higher the residual oil content adsorbed to the soil, which also reduced the contaminant leaching and increased the contaminated area. The highest retention of diesel oil occurred with the soil presenting 15% moisture, without rainfall and 0% biosurfactant concentration, with levels of 130.33 g/kg in the presence of surfactin and 130.97 g/kg in the presence of rhamnolipid.

The addition of biosurfactants at the concentrations used was not a significant factor and did not interfere with the final result evaluated. Thus, it can be said that the insertion of surfactin or rhamnolipid in sufficient quantity for effective bioremediation does not affect the percolation of the contaminant in the soil. Another point worth mentioning is the importance of monitoring moisture and the incidence of rainfall in field bioremediation, which will contribute to the effectiveness of the treatment results.



## Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001, by the Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) and by the University of Passo Fundo (UPF).

## 4.5 References

- Abdollahinejad, B., Pasalari, H., Jafari, A.J., Esrafil, A., Farzadkia, M., 2020. Bioremediation of diesel and gasoline-contaminated soil by covermicomposting amended with activated sludge: Diesel and gasoline degradation and kinetics. *Environ. Pollut.* 263, 114584. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114584
- AGAE Technologies, 2017. Online at <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=R90&LotNo=AGA061119B&brandTest=SIGMA>
- Ali, N., Dashti, N., Al-Mailem, D., Elias, M., Radwan, S., 2012. Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 812-820. doi: 10.1007/s11356-011-0624-z
- Almansoori, A.F., Hasan, H.A., Idris, M., Abdullah, S.R.S., Anuar, N., 2015. Potential application of a biosurfactant in phytoremediation technology for treatment of gasoline-contaminated soil. *Ecol. Eng.* 84, 113-120. doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.08.001
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2011. Standard Practice for Classification of Soils for Engineering Purposes (Unified Soil Classification System). ASTM D2487-11, West Conshohocken, United States
- Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., Casares, J.J., 2018. Environmental fate of petroleum hydrocarbons in soil: review of multiphase transport, mass transfer, and natural attenuation processes. *Pedosphere.* 28, 833-847. doi: 10.1016/S1002-0160(18)60046-3
- Baptista, S.J., 2007. Evaluation of the use of biosurfactant in the bioremediation of soils contaminated with diesel oil, doctoral thesis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (in Portuguese)
- Barros Neto, B., Scarmínio, I.S., Bruns, R.E., 2001. How to do experiments-research and development in science and industry, Campinas:UNICAMP, 401 p. (in Portuguese)
- Box, G.E.P., Wetz, J., 1973. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. University of Wisconsin Technical Report, n.9
- Bruns, R.E., Scaramino, I.S., Barros Neto, B. 2006. Statistical Design: Chemometrics. Elsevier: Amsterdam. 412 p. ISBN 0-444-52181-X
- Chen, Y-A., Liu, P-W.G., Whang, L-M., Wu, Y-J., Cheng, S-S, 2020. Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. *J. Biosci. Bioeng.* 129, 603-612. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.12.001
- Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Yang, C., Lai, C., Zhang, C., Liu, Y., 2017. Tween 80 surfactant-enhanced bioremediation: toward a solution to the soil contamination by

hydrophobic organic compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 17-30. doi: 10.1080/07388551.2017.1311296

Chiou, C.T., 2002. Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. doi: 10.1002/0471264326

Cui, Y.J., Delage, P., Alzoghbi, P., 2003. Retention and transport of a hydrocarbon in a silt. *Géotechnique*. 53, 83-91. doi: 10.1680/geot.2003.53.1.83

Dai, X., Lv, J., Yan, G., Chen, C., Guo, S., Fu, P., 2020. Bioremediation of intertidal zones polluted by heavy oil spilling using immobilized laccase-bacteria consortium. *Bioresour. Technol.* 309, 123305. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123305

Decesaro, A., Machado, T.S., Cappellaro, A.C., Rempel, A., Margarites, A.C., Reinher, C.O., Eberlin, M.N., Zampieri, D., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Biosurfactants production using permeate from whey ultrafiltration and the bioproduct recovery by membrane separation process. *J. Surfact. Deterg.* 23, 539-551. doi: 10.1002/jsde.12399

Decesaro, A., Rampel, A., Machado, T.S., Thomé, A., Reddy, K., Margarites, A.C., Colla, L.M., 2016. Bioremediation of soil contaminated with diesel and biodiesel fuel using biostimulation with microalgae biomass. *J. Environ. Eng.* 143, 04016091. doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001165

Decesaro, A., Rigon, M.R., Thomé, A., Colla, L.M., 2013. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *New Chem.* 36, 947-954 (in Portuguese). doi: 10.1590/S0100-40422013000700005

Gaylarde, C.C., Bellinaso, M.L., Manfio, G.P., 2005. Biological and technical aspects of xenobiotic bioremediation. *Biotechnology Science and Development*. 36-43 (in Portuguese)

Guiguer, N., 2000. Pollution of groundwater and soil caused by leaks at filling stations. *Waterloo Hydrogeologic, Brazil* (in Portuguese)

Hu, J., Yangyang, T., Teng, H., Yu, L., Zheng, M., 2014. The probabilistic life time prediction model of oil pipeline due to local corrosion crack. *Theor. Appl. Fract. Mech.* 70, 10-18. doi: 10.1016/j.tafmec.2014.04.002

Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G., Arima, K., 1969. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric. Boil. Chem.* 33, 971-72

Karthick, A., Roy, B., Chattopadhyay, P., 2019. A review on the application of chemical surfactant and surfactant foam for remediation of petroleum oil contaminated soil. *J. Environ. Manage.* 243, 187-205. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.04.092

Khayati, G., Barati, M., 2017. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: optimization strategy using Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Environ. Process.* 4, 451-461. doi: 10.1007/s40710-017-0244-9

Kreling, N.E., Simon, V., Fagundes, V.D., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Simultaneous production of lipases and biosurfactants in solid-state fermentation and use in bioremediation. *J. Environ. Eng.* In press. doi: 10.1061/15 (ASCE)EE.1943-7870.0001785

Ławniczak, Ł., Marecik, R., Chrzanowski, Ł., 2013. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2327-2339. doi: 10.1007/s00253-013-4740-1

Ma, K-Y., Sun, M-Y., Dong, W., He, C-Q., Chen, F-L., Ma, Y-L., 2016. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1

for bioremediation of crude oil. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 6, 144-151. doi: 10.1016/j.bcab.2016.03.008.

Martínez-Toledo, A., Rodríguez-Vázquez, R., 2013. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 595–605. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>

Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 14852–14861. doi: 10.1007/s11356-015-4488-5

Nwankwegu, A.S., Onwosi, C.O., 2017. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environ. Technol. Innov.* 7, 1-11. doi: 10.1016/j.eti.2016.11.003

Onur, G., 2015. Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters, masters dissertation, Middle East Technical University, Turkey

Ortega-Calvo, J.J., Lahlou, M., Saiz-Jimenez, C., 1997. Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40, 101-106. doi: 10.1016/S0964-8305(97)00045-0

Ortega-Calvo, J.J., Tejada-Agredano, M.C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J.L., Cantos, M., 2013. Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *J. Hazard. Mater.* 261, 733-745. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.03.042

Pacwa-Płociniczak, M., Plaza, G.A., Poliwoda, A., Piotrowska-Seget, Z., 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 9385-9395. doi: 10.1007/s11356-014-2872-1

Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J., 2011. Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. *Chemosphere.* 83, 29-33. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.01.024

Petrobras BR, 2018. Chemical Product Safety Information Sheet - S10 diesel oil. Online at <https://www.br.com.br/wcm/connect/27a863d0-2a28-4cdc-85e3-e98a2476e06f/fispq-comb-oleodiesel-auto-oleodiesel-s10-b7-ex.pdf> (in Portuguese)

Praveesh, B.V., Soniyamby, A.R., Mariappan, C., Kavithakumari, P., Palaniswamy, M., Lalitha, S., 2011. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp from soil using whey as carbon source. *New York Science Journal.* 4, 99-103

Schlosser, R.T., 2017. Influence of physical, chemical and mineralogical characteristics of two latosols in the movement of diesel and biodiesel, masters dissertation, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (in Portuguese)

Silva-Castro, G.A., SantaCruz-Calvo, L., Uad, I., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., Calvo, C., 2012. Treatment of diesel-polluted clay soil employing combined biostimulation in microcosms. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 9, 535-542. doi: 10.1007/s13762-012-0060-8

Statsoft, 1999. Statistica for Windows. Version 5.5. [S.I.]: StatSoft South America

Streck, E.V., Kampf, N., Dalmolin, R.S.D., Klamt, E., Nascimento, P.C., Schneider, P., Giasson, E., Pinto, L.F.S., 2008. Soils from Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil. (in Portuguese)

Thomé, A., Cecchin, I., Reginatto, C., Colla, L.M., Reddy, K.R., 2017. Biostimulation and rainfall infiltration: influence on retention of biodiesel in residual clayey soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 9594-9604. doi: 10.1007/s11356-017-8670-9

Thomé, A., Reginatto, C., Cecchin, I., Colla, L.M., 2014. Bioventing in a residual clayey soil contaminated with a blend of biodiesel and diesel oil. *J. Environ. Eng.* 140, 06014005. doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000863

USEPA, US, 2007. Environmental Protection Agency. Method 3350C. Online at <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3550c.pdf>

Zeng, Z., Liu, Y., Zhong, H., Xiao, R., Zeng, G., Liu, Z., Cheng, M., Lai, C., Zhang, C., Liu, G., Qin, L., 2018. Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds. *Sci. Total Environ.* 634, 1–11. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.349

Zhang, C., Wang, W., Duan, A., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Tan, X., Cheng, M., Wang, R., Zhou, C., Xiong, W., Yang, Y., 2019. Adsorption behavior of engineered carbons and carbon nanomaterials for metal endocrine disruptors: experiments and theoretical calculation. *Chemosphere.* 222, 184-194. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.128

## 5 CAPÍTULO IV: Biostimulation of the in situ production of biosurfactants during the bioremediation of diesel oil in clayey soil<sup>3</sup>

### Abstract

Despite the continuous advances in the understanding of the mechanisms related to the bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons, there are gaps regarding the assessment of the production of biosurfactants in situ. The objective of this work was to verify the effects of biostimulation (ammonium sulfate or whey) and bioaugmentation (*B. methylotrophicus*) on the in situ production of biosurfactants in soil, evaluated by the determination of surface tension, during the bioremediation of diesel oil-B10. Biostimulation (ammonium sulfate/whey) achieved a total removal of the contaminant of 40%. The application of biostimulation and bioaugmentation together resulted in the removal of 61.64% of the contaminant, 28.04% higher in relation to natural attenuation. For bioaugmentation and biostimulated soils, a decrease in surface tension was observed, indicating the production of biosurfactants in the soil (44.33 mN/m), which was not observed in natural attenuation (61.49 mN/m) or control treatment (64.45 mN/m). In sterile soil, the sorption values were around 20%, showing that there were no different rates of adsorption of the contaminant. Thus, it was found that the joint application of biostimulation and bioaugmentation techniques helped in the production of biosurfactants directly in the soil and increased the biodegradation of diesel oil-B10 in the soil.

**Keywords:** biosurfactant, hydrocarbons, bioremediation, adsorption

### 5.1 Introdução

The modern lifestyle and industrialization have led to soil and water contamination. The most common environmental pollutants are heavy metals and hydrocarbons (Makombe; Gwisai, 2018). The main factor that hinders the microbiological decomposition of oil and oil products is the hydrophobicity of hydrocarbon molecules, which leads to their sorption on different surfaces and transition to a biologically difficult to access form, due to their high interfacial tension and low water solubility, which hinders its remediation at the contaminated site (Ayangbenro; Babalola, 2017; Bhati et al., 2019; Kapoor et al., 2019), as well as the failure

---

<sup>3</sup> Andressa Decesaro, Antônio Thomé, Luciane Maria Colla

of effective contact with microbial cells, which generally have a hydrophilic outer layer (Korshunova et al., 2019).

This barrier can be removed with the application of biosurfactants, amphiphilic compounds that are combined by hydrophilic and hydrophobic fractions (Lang, 2002; Satpute et al., 2010; Santos et al., 2016). This composition causes the biocompound to have surfactant properties, such as reducing surface and interfacial tension in aqueous solutions and hydrocarbon mixtures (Desai; Banat, 1997; Banat et al., 2000; Singh et al., 2020). The mechanism of its action is determined by the processes of desorption of organic pollutants and their transfer to the aqueous phase and, consequently, by the increase of their bioaccessibility by microorganisms, as well as by the modification of the external surface of the bacteria in the form of hydrophobization for better contact with hydrocarbon molecules (Pirog et al., 2015; Santos et al., 2016).

The application of biosurfactants, through bioremediation, presents a perspective beyond conventional techniques, however, despite the several advantages and good properties on the chemical surfactant, the main disadvantages are still related to the high cost of production, low production yield, high costs of downstream and recovery (Araujo et al., 2019). In addition, the difficulties in synthesizing large quantities of biocompound for environmental applications also have limitations (Jimoh; Lin, 2019).

For this reason, performing biostimulation in order to increase the production of biosurfactant in the soil (during bioremediation processes) can be more efficient and present lower costs than the production of these compounds in bioprocesses followed by purification or recovery and application in contaminated area (Machado et al., 2020). Whey has already been used by some authors as a biostimulant in soil during bioremediation processes (Jonsson; Östberg, 2011; Machado et al., 2020), due to its nutritional composition. In addition, it is a by-product of significant importance, since it is also used in the production of biosurfactants in bioprocesses (Kosseva; Kent, 2013, Decesaro et al., 2020).

Despite numerous scientific articles on biodegradation of hydrocarbons with the use of bacteria synthesizing biosurfactants, little is known about the production of these substances by microorganisms directly in the soil (Korshunova et al., 2019), when microorganisms that have been proven to produce biosurfactants are used for bio-augmentation. The effective use of these compounds in environmental treatment processes requires additional data on the structure of biosurfactants and their interaction with the soil and additional data on pollutants and their effects on the native microbiota, as well as the

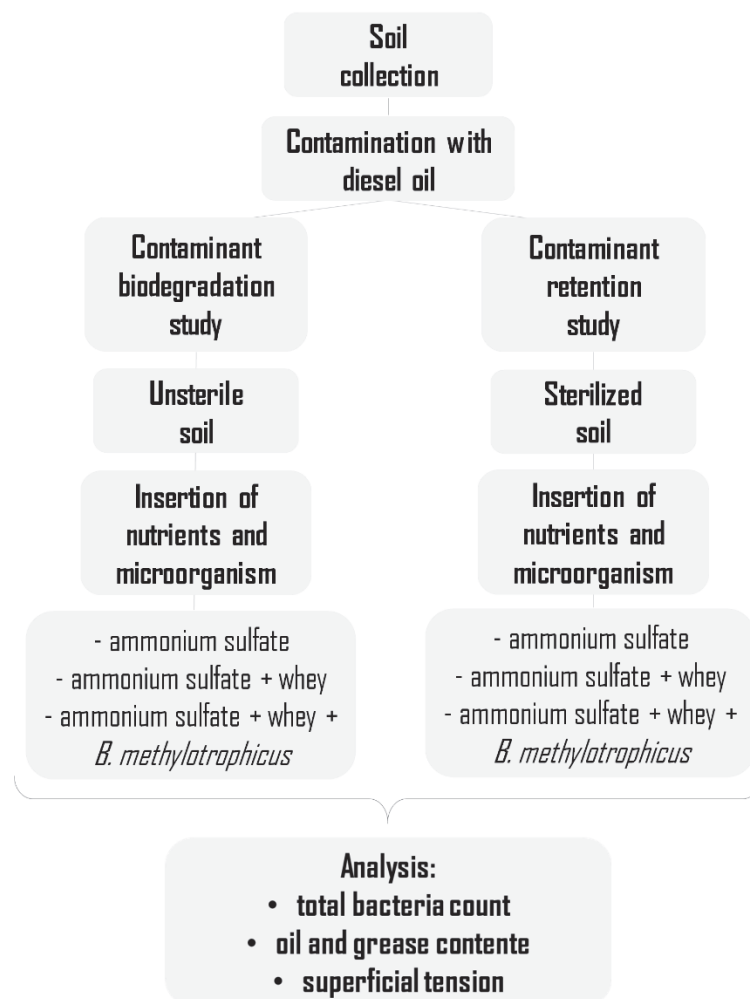
development of methods to monitor their content in the soil and new economic production technologies (Decesaro et al., 2017).

This work aimed to verify the effects of biostimulation (insertion of ammonium sulphate and whey) and the bioaugmentation with the bacterium *B. methylotrophicus*, in order to evaluate the biodegradation of diesel oil, showing the production of biosurfactants in the soil through the superficial tension. In addition, the application of biostimulation and/or bioaugmentation in sterile soil was evaluated to determine the effects on contaminant retention.

## 5.2 Material and methods

Figure 1 shows the general flowchart for the methodology applied in the study.

Figure 1: Flowchart with the steps of the applied methodology.



### 5.2.1 Characterization of whey

The whey was collected after the cheese making process and characterized through physical-chemical analysis according to the Adolfo Lutz Institute (2008), presenting 0.44% ash, 0.30% lipids, 3.72% lactose, 94.67% moisture, 5.33% of total solids, 0.53% of proteins (AOAC, 2005), and pH 6.92.

### 5.2.2 Soil

The soil was collected (50 kg) in a deformed state 1.2 meters deep in the experimental area of the University of Passo Fundo (geographical coordinates 28°13'34.75 "S and 52°23'11.09" O, datum WGS84), and kept in ventilated place for drying, reaching a minimum humidity of 3.3%. Afterwards, the soil was passed through a sieve (mesh 10, 2.00 mm), according to the American Society for Testing and Materials (ASTM, 2013). The soil was classified pedologically as Red Dystrophic Red Latosol (Streck et al., 2008) and geotechnically as high plasticity clay (ASTM, 2017). The soil is characterized by being very porous and had a high void rate, typical of residual clay soil, resulting in high permeability (Thomé et al., 2014).

### 5.2.3 Bioremediation assay

The bioremediation assays were carried out in cylindrical plastic containers (12 cm in diameter and 14 cm in height), with 1 kg of soil in each treatment. The soil was contaminated with 20% diesel oil-B10, a mixture with 90% diesel oil and 10% biodiesel, (m/m dry basis), resulting in a concentration of 200 g/kg, in order to carry out the simulation of extensive contamination with this type of fuel, such as those that occur in road accidents.

Ammonium sulfate was used as nitrogen source, being added based on the optimal ratio for microbial growth (C: N - 100: 10). Considering the addition of 200 g/kg of diesel oil and its composition with around 85% carbon, it reached 169.92 g of added C. Thus, it was necessary to insert 80.18 g/kg of ammonium sulfate, since nitrogen represents 21.19% of the total composition of ammonium sulfate, resulting in 16.99 g of N. Whey was inserted because it contains a simpler source of carbon, in addition to the presence of proteins and lactose (source of C and N), to stimulate the growth of microorganisms, being added in the proportion of 10% (v/m), resulting in the C:N ratio of 100:9.92. The nitrogen source and whey were



previously used by Decesaro et al. (2020) in the production of biosurfactant under laboratory conditions, using a liquid medium in a submerged fermentation process.

In experiments in which the bioaugmentation technique was applied, the inoculum of the microorganism *Bacillus metylotrophicus* was carried out. Two loops of microorganisms from tubes with PCA (plate count agar) were transferred to the plate count (PC) medium (tryptone, 5 g/L; yeast extract, 2.5 g/L; glucose, 1 g/L), after they were incubated for 24 h for growth (absorbance 0.8 to 660 nm). Subsequently, 20 mL of the culture medium was centrifuged with the presence of the bacteria, in order to separate the microorganism, and then added to the soil in 7 mL of sterile distilled water.

The different treatments were compared with the natural attenuation treatment (without the insertion of nutrients and/or microorganisms) and with the control treatment (soil only). The initial soil moisture was adjusted to 34% and the experiments were conducted at room temperature.

Table 1 shows the experimental design used to evaluate the production of biosurfactants in the soil and the biodegradation of the contaminant. All tests were performed in duplicate and monitored for a period of 120 days. To consider the effects of sorption and desorption present in the clayey soil, parallel tests were carried out with the same experimental configuration, however, the entire system (soil, nutrients, microorganism, water) was sterilized in an autoclave for 20 min at 121 °C in properly containers sealed, before the beginning of the experiment.

Table 1 - Experimental design of the bioremediation assay.

Treatment	Bioremediation technique	Nutrients	Contaminant	Sterilized soil
1	Biostimulation	8.018% m/m ammonium sulfate + 10.7% water	20% diesel oil-B10	No
2	Biostimulation	8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + 0.7% water	20% diesel oil-B10	No
3	Biostimulation and bioaugmentation	8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + <i>B. metylotrophicus</i> in 0.7% water	20% diesel oil-B10	No
4	Natural attenuation	10.7% water	20% diesel oil-B10	No
5	Controle	30.7% water	-	No
6	Biostimulation	8.018% m/m ammonium sulfate + 10.7% water	20% diesel oil-B10	Yes

7	Biostimulation	8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + 0.7% water	20% diesel oil-B10	Yes
8	Biostimulation and bioaugmentation	8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + <i>B. methylotrophicus</i> in 0.7% water	20% diesel oil-B10	Yes
9	Natural attenuation	10.7% water	20% diesel oil-B10	Yes

**Ammonium sulfate:** 8.018% m/m, corresponding to 80.18 g/kg; **Whey:** 10% v/m, corresponding to 100 mL/kg; ***Bacillus methylotrophicus*:** bacteria obtained after centrifugation, added to 7 mL of sterile distilled water, corresponding to 0.7% v/m – 7 mL/kg; **Diesel oil:** 20% m/m, considering the density of diesel oil equal to 0.829, corresponding to 241.14 mL/kg;

The samples were collected after the soil turning, every 30 days, making the following analytical determinations: soil moisture content, according to NBR 6.457 (ABNT, 1986), oil and grease content, according to the Method 3350 C (USEPA, 2007), total bacterial count (MAPA - Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, 2003) and determination of the surface tension of soil extracts, to verify the production of produced biosurfactants. Soil moisture measurements throughout the experiment were used to calculate the removal of contaminants.

The extraction of biosurfactants from the soil was carried out by adapting the method of Martínez-Toledo and Rodríguez-Vázquez (2013), with a sample of 10 g of soil being added to erlenmeyer flasks with 50 mL of distilled water and stirred in a shaker for 1 h at 150 rpm and 25 °C. The samples were then filtered with a 20 µm cellulose acetate membrane to remove coarse soil particles (first filtration) and then with a 0.22 µm cellulose membrane to leave the solution free of impurities (second filtration). The resulting liquid extract was used to verify the production of biosurfactants by surface tension, according to the Du Noüy ring method (Noüy, 1919). The surface tension reading is automatically detected and occurs when the lamella formed between the ring and the medium breaks.

#### 5.2.4 Statistical analysis of data

Data treatment was performed using ANOVA and a means comparison test (Tukey's test) with a 95% confidence level ( $p < 0.05$ ), using the Software Statistica 5.5. For the analysis of variance of the results of the microbial count, these were initially converted through logarithmic normalization (LOG (10)) to analyze the data on a common basis.

## 5.3 Results and discussion

### 5.3.1 Microbial growth during bioremediation

Table 2 shows the results of microbial counting during the bioremediation process.

Table 2 - Total count of bacteria present in the soil during 120 days of bioremediation.

Treatment	Total bacteria counts <sup>a</sup> (log CFU/g soil)				
	0 days	30 days	60 days	90 days	120 days
1	4.26±1.07 <sup>aA</sup>	3.84±0.52 <sup>aA</sup>	3.46±0.02 <sup>aA</sup>	2.72±0.05 <sup>aA</sup>	2.67±0.09 <sup>aA</sup>
2	4.20±0.44 <sup>aB</sup>	3.96±0.34 <sup>aAB</sup>	3.57±0.04 <sup>aAB</sup>	2.81±0.31 <sup>aA</sup>	3.02±0.24 <sup>abAB</sup>
3	4.81±0.33 <sup>aA</sup>	4.46±0.24 <sup>aA</sup>	5.12±0.20 <sup>cA</sup>	4.59±0.02 <sup>bA</sup>	4.32±0.09 <sup>cA</sup>
4	4.78±0.07 <sup>aC</sup>	4.66±0.09 <sup>abC</sup>	3.61±0.02 <sup>aB</sup>	2.91±0.00 <sup>aA</sup>	3.44±0.00 <sup>bB</sup>
5	5.96±0.14 <sup>aB</sup>	5.85±0.00 <sup>bB</sup>	4.70±0.05 <sup>bA</sup>	5.39±0.60 <sup>bAB</sup>	5.42±0.05 <sup>dAB</sup>

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation. CFU: colony forming unit. Equal letters (lower case for the same column, indicate the difference between treatments at the same time; upper case letters for the same line, indicate the difference in the same treatment over time) for a 95% confidence level. **Treatment 1:** Biostimulation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 2:** Biostimulation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + 0.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 3:** Biostimulation and bioaugmentation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + *B. methylotrophicus* in 0.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 4:** Natural attenuation (10.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 5:** Control (30.7% water).

Treatments 1 and 2, with the application of the biostimulation technique, showed a decline in the total number of bacteria as a function of time. There was a statistical difference only for Treatment 2, where the lowest number of bacteria could be observed in 90 days (2.81 ± 0.31 log CFU/g soil).

Treatment 3 (biostimulation + bioaugmentation) presented the highest number of microorganisms, when comparing the experiments with the presence of diesel oil (Treatments 1, 2, 3, and 4), during the 120 days of the experiment, indicating that techniques of biostimulation and bioaugmentation applied together proved to be efficient for a greater number of microorganisms. The greatest microbial growth (5.12 ± 0.20 log CFU/g soil) was observed after 60 days of experiment, this was due to the microorganisms, both those added and those present in the soil, already being adapted to the medium and there are still enough nutrients available in sufficient quantity.

The natural attenuation technique (Treatment 4), showed the greatest decline in the number of microorganisms (95.7%), when comparing the times of 0 and 120 days, indicating that the autochthonous microorganisms were influenced by the lack of nutrients and by the

toxicity of the contaminant, added at a concentration of 200 mg/kg, which exceeds the soil's adsorption capacity, decreasing permeability and voids index, as well as oxygenation. Treatment 5, which consists of control, without the application of any treatment and without contamination, presented the largest number of microorganisms after 120 days ( $5.12 \pm 0.20$  log CFU/g soil), confirming the toxicity effect of the contaminant to native microorganisms, since the initial treatment time, for all assays.

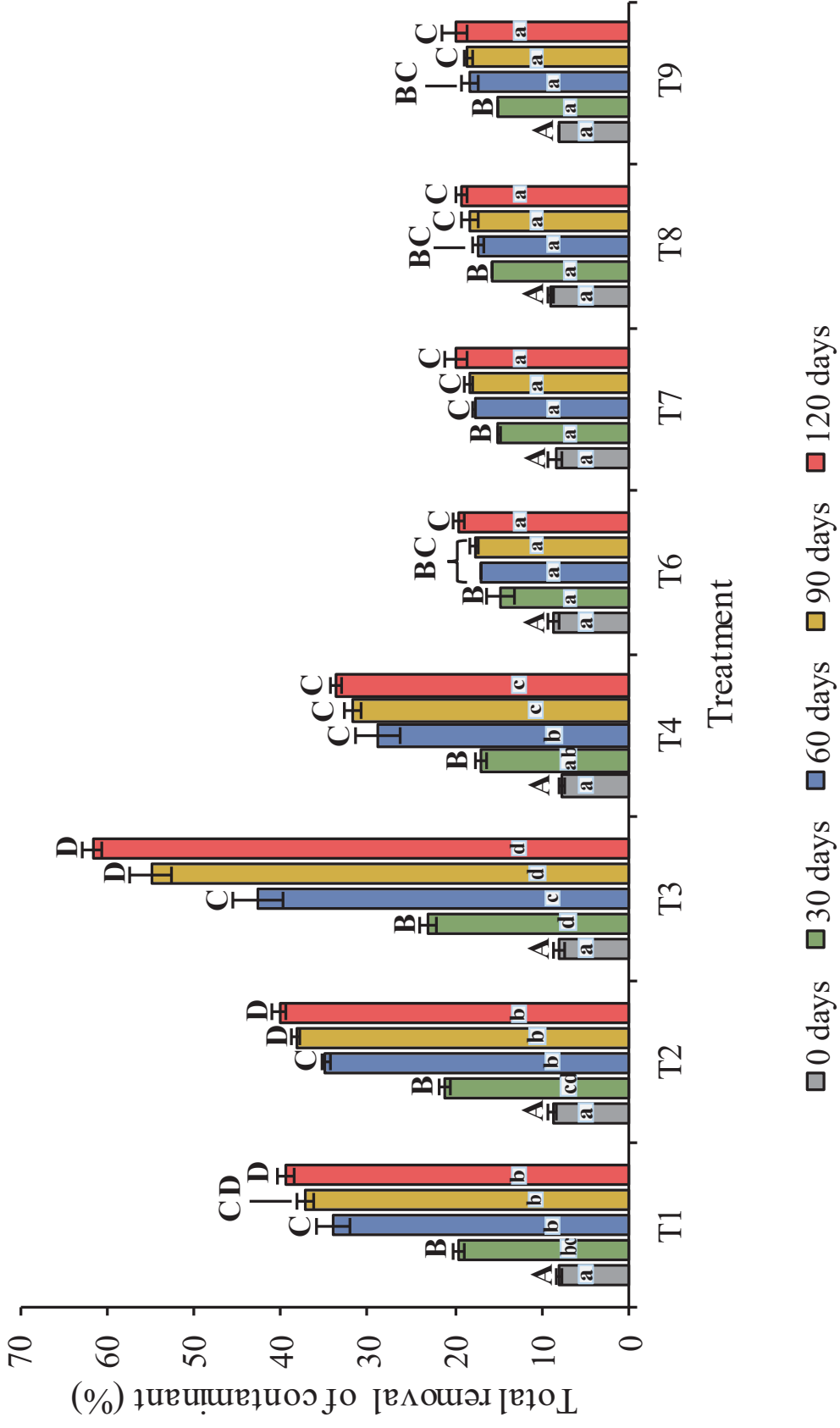
The reduction in microbial populations over time, in biostimulated treatments, can be explained by the consumption of the nutrients inserted to support growth during the experimental period (Machado et al., 2020), different from the observed in the treatment in bioaugmentation applied together with biostimulation, in which higher growth and maintenance of microorganisms were observed.

### **5.3.2 Removal of the contaminant during bioremediation**

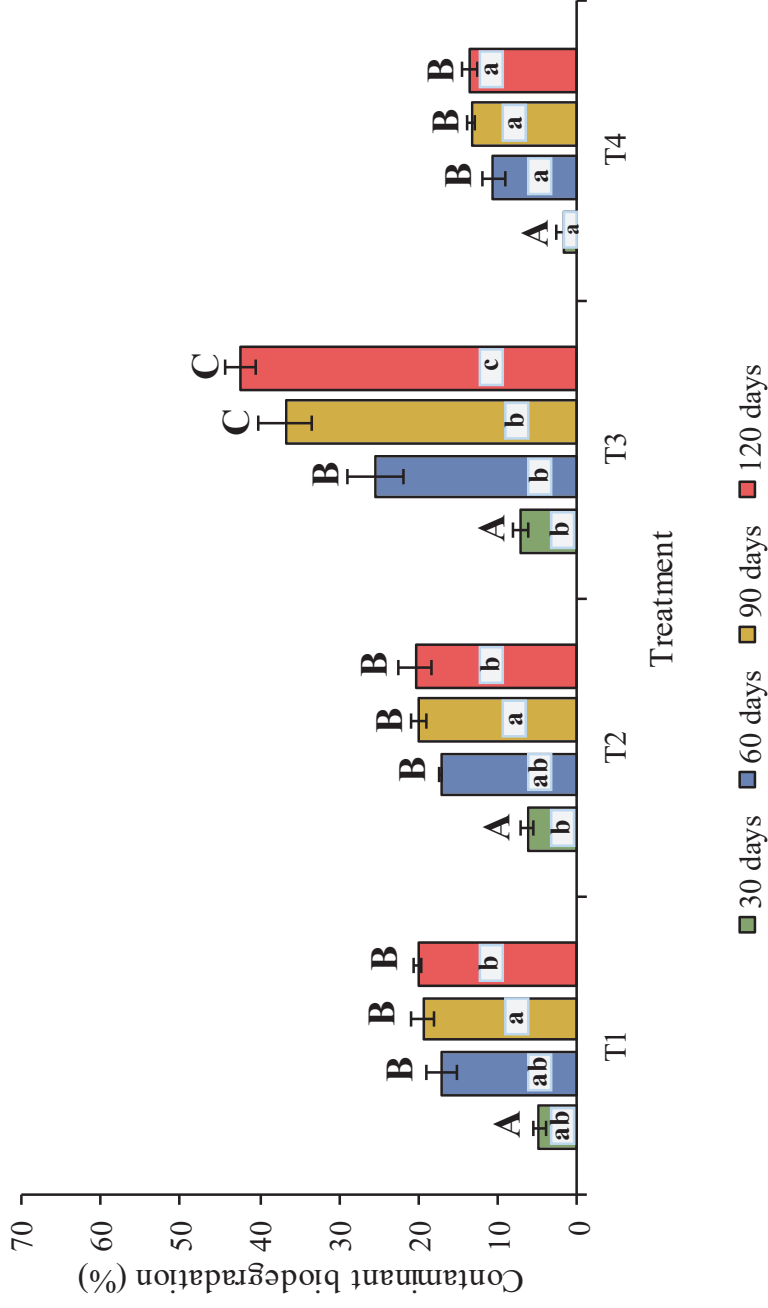
Figure 2 (a) shows the percentage of total removal of the contaminant during bioremediation. Treatment 5 was not evaluated, since it is the control treatment, in which no diesel oil was inserted. Treatments 6, 7, 8 and 9 were performed with sterile soil, under the same conditions as Treatments 1, 2, 3 and 4. Figure 2 (b) shows the percentage of biodegradation, indicated by total removal minus adsorption, being that in the initial time (0 days), it was equal to zero, since there was no time for the beginning of biodegradation.

Figure 2: Removal of the contaminant obtained during the bioremediation experiment: a) total removal; b) biodegradation.

a)



b)



Equal letters (lower case for the same column, indicate the difference between treatments at the same time; upper case letters for the same line, indicate the difference in the same treatment over time) for a 95% confidence level. **Treatment 1:** Biostimulation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 2:** Biostimulation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + 0.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 3:** Biostimulation and bioaugmentation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + *B. methylotriphicus* in 0.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 4:** Natural attenuation (10.7% water + 20% diesel oil); Treatment 5: Control (30.7% water).

The removal levels obtained at the initial moment of bioremediation (0 days), as well as the experiments with sterilized soil, do not represent the biodegradation of the contaminant, but rather, the adsorption in the soil due to adhesion to the soil matrix.

The highest adsorption occurred up to the 30 days of the experiment, around 15% for all experiments, which can be justified since the more accelerated process of sorption of the contaminant in clayey soil occurs in 15 days, proving that the interactions are more active on the mineral surface of the soil (Thomé et al., 2017). After this period, subsequent sorption is associated with the migration of the contaminant to internal areas, less accessible in the soil matrix, due to its hydrophobicity and strong sorption in the sediment (Lee et al., 2018).

After the 120 days of the experiment, the sorption values were between 19.22% and 20.01%, which did not differ statistically, showing that the different biostimulants did not promote different rates of adsorption of the contaminant. The verified values were close to those found by Kreling et al. (2020), Decesaro (2016) and Thomé et al. (2014). According to Kavitha et al. (2014), the clay soil has a high hydrocarbon adsorption capacity compared to other types of soil.

Regarding the removal of contaminant, after 120 days of monitoring the assays, the application of biostimulation and/or bioaugmentation presented positive results compared to the application of natural attenuation (T4).

The biostimulated treatments (T1 and T2) carried out with the addition of ammonium sulphate and ammonium sulphate + whey, respectively, reached total removal of contaminant around 40%, not differing statistically from each other ( $p > 0.05$ ), indicating that the addition of whey as a simpler source of carbon did not have significant effects, possibly due to the amount of diesel oil as a carbon source being much higher than that provided by whey. Other authors have reported positive effects by providing easily accessible carbon and micronutrients (Jonsson; Östberg, 2011; Östberg et al., 2007a, 2007b), however, there were differences between the studies cited and our study.

Jonsson and Östberg (2011) was several applications of whey over time (210 mg/kg every 14 days of fermented whey) and a single addition of a single addition of 2100 mg/kg of sweet whey, in sandy soil contaminated with 5 g/kg of diesel oil, in both cases there were improvements in the mineralization of the contaminant. In our study, the contamination was 200 g/kg of contaminant and whey was added only once, at the beginning of the experiment, both conditions may have been the cause of the absence of significant differences when compared to the T1 experiments (without whey) and T2 (with whey).

Östberg et al., (2007b) verified that the addition of 6 or 60 ml of fermented whey/kg of soil increased the degree of biodegradation of the contaminant. Similarly, Östberg et al. (2007a) also obtained similar results for the biodegradation of n-hexadecane in sandy soil through the addition of fermented whey. In addition, for the biodegradation of n-hexadecane, Östberg et al. (2007a) concluded that the addition of fermented whey can be replaced by the addition of lactate, amino acids, lactose and vitamins, as they are the main constituents of this agro-industrial by-product. However, in both studies, contamination with diesel oil was 5 g/kg, well below the contaminant concentration in our study (200 g/kg).

Treatment 3 (biostimulation + bioaugmentation) stood out, with a total removal value of 61.64%, an increase of 28.04% in relation to the application of natural attenuation (T4). The *B. methylotrophicus* used was previously isolated from soil contaminated with diesel oil (Decesaro et al., 2013), which may justify its ability and contribution to the bioremediation process, since bacteria isolated from areas contaminated by diesel oil develop a differentiated metabolism that can make them more effective in the degradation of the contaminant (Horel; Schiewer, 2014, Nath et al., 2012; Purwanti et al., 2018; Titah et al., 2018), due to having been exposed to contaminant, presenting adaptability, resistance, tolerance and some enzymatic changes and/or deviations to carry out cellular metabolism in a more hostile contaminated environment (Das; Chandran, 2011; Kumar; Gopal, 2015; Wu et al., 2014).

The percentage of biodegradation, after 120 days, (Figure 2 (a)), was around 20% for treatments with the application of biostimulation (T1 and T2), corresponding to the mineralization of approximately 40 g diesel/kg of soil. For the treatment with the application of the techniques of biostimulation and bioaugmentation together (T4), the mineralization was around 85 g diesel/kg of soil, that is, 42.42%, being much higher than the treatment with the application of natural attenuation (13.59%). It should be mentioned that although the removal values may seem low, the contamination added in the initial time is high, much higher than that normally used when the maximum adsorption capacity of this type of contaminant is obeyed in clay soils (around 4%, according to Thomé et al. (2014)).

Thus, it appears that the selection of bacterial species to be used as a biodegradation agent is very important, being that bacteria of the genus *Bacillus* sp. they are widely known as superior and specific bacteria for that use (Hasan et al., 2016; Mnif et al., 2015; Purwanti et al., 2015; Kaur et al., 2014), as they have the ability to attack the rings benzene content of aromatic hydrocarbons. The breaking of the aromatic rings facilitates the attack of other species, since not all bacteria can carry out this enzymatic reaction.

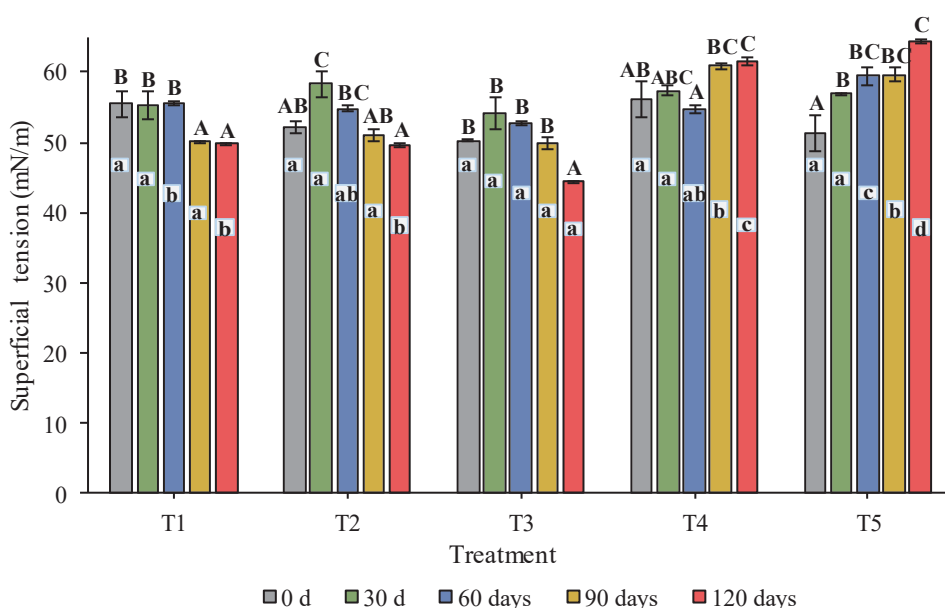


According to Imron et al. (2020), a single bacterial culture can be used in the treatment, which can be proven in our study, in which a single bacterial culture was added only to increase the solubility of diesel and/or break the aromatic rings, being that the next degradation was carried out with the help of the surrounding indigenous microorganisms that did not have this ability.

### 5.3.3 Production of biosurfactant in the soil during bioremediation

Figure 3 shows the surface tension values obtained, through the readings of the soil extracts, during the bioremediation period.

Figure 3. Surface tension obtained from samples extracted from the soil during the 120 days of bioremediation.



Equal letters (lower case for the same column, indicate the difference between treatments at the same time; upper case letters for the same line, indicate the difference in the same treatment over time) for a 95% confidence level. **Treatment 1:** Biostimulation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 2:** Biostimulation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + 0.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 3:** Biostimulation and bioaugmentation (8.018% m/m ammonium sulfate + 10% whey + *B. methylotriphicus* in 0.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 4:** Natural attenuation (10.7% water + 20% diesel oil); **Treatment 5:** Control (30.7% water).

The tension measurement was performed from the soil extracts, with the objective of verifying the variation of the surface tension as an effect of the production of biosurfactants over time, as well as the differences between the treatments (Figure 3). The lowest surface tension was 44.33 mN/m, obtained for Treatment 3, after 120 days of bioremediation,

indicating that bio-stimulation plus bioaugmentation caused greater production of biosurfactants. Machado et al. (2020) also found such a tendency to reduce surface tension in soil extracts during bioremediation processes with the application of biostimulation and bioaugmentation techniques, where the minimum surface tension verified was 48.71 mN/m, indicating the release of compounds surfactants in the medium.

The comparison of surface tensions for the same treatment over the bioremediation time (capital letters) showed a reduction in surface tension values for Treatment 1 (biostimulation with ammonium sulfate), being 10.22%, Treatment 2 (biostimulation with ammonium sulfate and whey), with a reduction of 5.16%, and Treatment 3 (biostimulation with ammonium sulphate and whey and bioincrease with *B. methylotrophicus*), 11.82%, being significant for the three treatments ( $p < 0.05$ ), showing the production of the biocompound. For treatments 4 and 5 (natural attenuation and control) there was an increase in surface tension after 120 days of assays. Regarding the analysis of different treatments at the same time (lowercase letters), it was found that at the end of the experiment (120 days) there was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between all treatments, except between treatment 1 and 2.

The reduction in surface tension indicates that there was greater production of biosurfactants and, consequently, greater bioavailability of the contaminant. As bacteria can only degrade water-soluble pollutants, the bioavailability of diesel oil is an important factor in biodegradation (Sari et al., 2018). Bioavailability is described as the tendency for a substance to be absorbed by living organisms. Bacteria need to have direct contact with diesel to use it in their metabolisms. In biodegradation, bioavailability is also described as the water solubility of diesel, because bacteria can only use water-soluble compounds (Imron et al., 2020).

The addition of biosurfactant is necessary when environmental conditions do not support the process of dissolving diesel in water, however when the bacteria used are capable of producing biosurfactant in sufficient quantities, the addition is not necessary, as can be seen from this study. The use of biosurfactant-producing bacteria is a more efficient and ecological way to remove contaminants (Imron et al., 2020).

There are many advantages of this method, the main advantage is that it is ecological. It leaves almost no harmless substances in the environment after treatment (Dzionic et al., 2016). The bacteria involved in the degradation process will naturally decompose after application and, therefore, will not pollute the environment. Biodegradation is possibly the cleanest and most ecological technology to be applied in the treatment of diesel contamination in various environments.

Biodegradation by bacteria also offers a chance to improve the quality of contaminated soil. After the completion of the degradation processes, the residual bacteria will be decomposed by natural mechanisms. The decomposition of residual biomass releases various compounds from bacterial cells, such as C, N, P, S, K and other minerals (Bridgham et al., 2013; Panikov, 2016), which are essential elements that can increase soil fertility. These released compounds can be used as substitutes for soil fertilizer (Hossain et al., 2016; Pavlova, 2017).

#### **5.4 Conclusions**

The highest rate of removal of diesel oil obtained by the application of bioremediation was 61.64% in 120 days, a result 28.04% higher when compared to the natural attenuation technique. The production of biosurfactants in the soil, evaluated by measuring the surface tension of the soil extracts, showed a reduction in the surface tension for the bioaugmentation and biostimulation treatments (11.82%), indicating the release of biosurfactants in the medium. This trend was not observed in natural attenuation and control treatments. For sterile soil, the values referring to adsorption were around 20%, not differing statistically from each other, demonstrating that the different biostimulants did not promote different rates of adsorption of the contaminant.

#### **Acknowledgments**

This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and by the University of Passo Fundo (UPF).

#### **5.5 Referências**

- ABNT – Brazilian Association of Technical Standards, 1986. Soil samples - Preparation for compaction tests and characterization tests. NBR NBR 6, 457 Rio de Janeiro, Brazil (in Portuguese)
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists, 2005. Official methods of analysis (OMA). In: Horwitz, W., Latimer, G. (Eds.), eighteenth ed. (Washington)
- Araujo, H.W.C., Andrade, R.F.S., Montero-Rodriguez, D., Rubio-Ribeaux, D., Alves da Silva, C.A., Campos-Takaki, G.M., 2019. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microb. Cell Factories* 18, 2. doi: 10.1186/s12934-018-1046-0

- Arroz, S.D., Spies, R.B., Wolfe, D. A.E., Wright, B.A., 1996. Proceedings of the Exxon Valdez Oil Spill Symposium. Fisheries Society American, Bethesda, Maryland, EUA.
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2013. Standard Specification for Woven Wire Test Sieve Cloth and Test Sieves. ASTM E11 - 13, West Conshohocken, United States
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2017. Standard Practice for Classification of Soils for Engineering Purposes (Unified Soil Classification System) - D2487-17e1, ASTM International, West Conshohocken, PA, [www.astm.org](http://www.astm.org)
- Ayangbenro, A., Babalola, O., 2017. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14, 94. doi: 10.3390/ijerph14010094
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 495–508. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>
- Bhati, S., Kumar, V., Singh, S., Singh, J., 2019. Synthesis, biological activities and docking studies of piperazine incorporated 1,3,4-oxadiazole derivatives. *J. Mol. Struct.* 1191, 197 - 205. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.106>
- Bridgham, S.D., Ye, R., DeLaune, R.D., Reddy, K.R., Richardson, C.J., Megonigal, J.P., 2013. Organic matter mineralization and decomposition. <https://doi.org/10.2136/sssabookser10.c20>
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: in a overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011:1–13. doi:10.4061/2011/941810
- Decesaro, A., 2016. Production of biosurfactants from waste from the dairy industry for application in bioremediation processes. Dissertation (Master in Civil and Environmental Engineering) - University of Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil. <http://tede.upf.br:8080/jspui/handle/tede/1424> (in Portuguese)
- Decesaro, A., Machado, T.S., Cappellaro, A.C., Reinehr, C.O., Thomé, A., Colla, L.M., 2017. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 24, 20831–20843. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9778-7>
- Decesaro, A., Machado, T.S., Cappellaro, A.C., Rempel, A., Margarites, A.C., Reinher, C.O., Eberlin, M.N., Zampieri, D., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Biosurfactants production using permeate from whey ultrafiltration and the bioproduct recovery by membrane separation process. *J. Surfactants Deterg.* 23, 539–551. doi:10.1002/jsde.12399
- Decesaro, A., Rampel, A., Machado, T.S., Thomé, A., Reddy, K., Margarites, A.C., Colla, L.M., 2016. Bioremediation of soil contaminated with diesel and biodiesel fuel using biostimulation with microalgae biomass. *J. Environ. Eng.* 143, 04016091. doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001165
- Decesaro, A., Rigon, M.R., Thomé, A., Colla, L.M., 2013. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *New Chem.* 36, 947-954 (in Portuguese). doi: 10.1590/S0100-40422013000700005
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 1, 47–64

- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., Guzik, U., 2016. Natural carriers in bioremediation: a review. *Electron. J. Biotechnol.* 23, 28e36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>
- Hasan, H.A., Abdullah, S.R.S., Kofli, N.T., Yeoh, S.J., 2016. Interaction of environmental factors on simultaneous biosorption of lead and manganese ions by locally isolated *Bacillus cereus*. *J. Ind. Eng. Chem.* 37, 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.03.038>
- Horel, A., Schiewer, S., 2014. Influence of inocula with prior hydrocarbon exposure on biodegradation rates of diesel, synthetic diesel, and fish-biodiesel in soil. *Chemosphere* 109, 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.073>
- Hossain, M.Z., von Fragstein, P., Heß, J., 2016. Plant origin wastes as soil conditioner and organic fertilizer: a review. *Environ. Sci.* 16, 1362-1371. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2016.16.7.12961>
- Imron, M.F., Kurniawan, S. B., Ismail, N. I., Abdullah, S.R.S., 2020. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. *J. Clean. Prod.* 251, 119716. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119716>
- Instituto Adolfo Lutz, 2008. Physical-chemical methods for food analysis. In: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet (Coord.), fourth ed. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (in Portuguese)
- Jimoh, A.A, Lin, J., 2019. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Ecotoxi. Environ. Safe.* 184, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Jonsson, A.P., Östberg, T.L., 2011. The effects of carbon sources and micronutrients in whey and fermented whey on the kinetics of phenanthrene biodegradation in diesel contaminated soil. *J. Hazard Mater.* 192, 1171–1177. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.024>
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., Singh, J., 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* 19, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100182>
- Kaur, H., Kumar, A., Kaur, H., 2014. Bioremediation of hexavalent chromium in wastewater effluent by *Pseudomonas putida* (MTCC 102). *Int. J. Res. Earth Environ. Sci.* 1, 2311-2484
- Kavitha, V., Mandal, A.B., Gnanamani, A., 2014. Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: an approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 94, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.028>
- Korshunova, T.Y., Chetverikova, S.P., Bakaevaa, M.D., Kuzinaa, E.V., Rafikovaa, G.F., D.V. Chetverikovaa, Loginova, O.N., 2019. Microorganisms in the Elimination of Oil Pollution Consequences (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 55, 344–354. doi: 10.1134/S0003683819040094
- Kosseva, M.R., Kent, C.A., 2013. Thermophilic Aerobic bioprocessing technologies for food industry wastes and wastewater. In: Kosseva, M.R., Webb, C. (Eds.), *Food Industry Wastes*. Academic Press, pp. 171-189
- Kreling, N.E., Zapparoli, M., Margarites, A.C., Friedrich, M.T., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Extracellular biosurfactants from yeast and soil–biodiesel interactions during bioremediation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 17, 395–408 [doi.org/10.1007/s13762-019-02462-9](https://doi.org/10.1007/s13762-019-02462-9)

- Kumar, B.L., Gopal, D.V.R.S., 2015. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *3 Biotech.* 5, 867-876. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0293-6>
- Lang S., 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7, 1–2, 12–20. [https://doi.org/10.1016/s1359-0294\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/s1359-0294(02)00007-9)
- Lee, D.W., Lee, H., Kwon, B.-O., Khim, J.S., Yim, U.H., Kim, B.S., Kim, J.-J., 2018. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environ. Pollut.* 241, 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>
- Machado, T.S., Decesaro, A., Cappellaro, A.C., Machado, B.S., Reginato, K.V S., Reineh, C.O., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil. *Ecotox. Environ Safe.* 201, 110798. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110798>
- Makombe, N., Gwisai, R.D., 2018. Soil remediation practices for hydrocarbon and heavy metal reclamation in mining polluted soils. *Sci. World J.* 2018, 7. <https://doi.org/10.1155/2018/5130430>
- MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply), Normative Instruction n° 62, of 26/08/2003, 2003. Official Analytical Methods for Microbiological Analyzes for the Control of Animal Products and Water - Chapter I: Standard Count of Mesophilic Aerobic Strict and Facultative Viable Microorganisms. Official Diary of the Union, Brazil (in Portuguese)
- Martínez-Toledo, A., Rodríguez-Vázquez, R., 2013. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 595–605. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>
- Meneghetti, L.R.R. 2007. Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Universidade de Passo Fundo, Brasil
- Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 14852–14861. doi:10.1007/s11356-015-4488-5
- Nath, S., Deb, B., Sharma, I., 2012. Isolation and characterization of cadmium and lead resistant bacteria. *Glob. Adv. Res. J. Microbiol.* 1, 194-198
- Noüy, P.L.D., 1919. A new apparatus for measuring surface tension. *J. Gen. Physiol.* 1, 521–524. <https://doi.org/10.1085/jgp.1.5.521>
- Östberg, T.L., Jonsson, A.P., Bylund, D., Lundström, U.S., 2007a. The effects of carbon sources and micronutrients in fermented whey on the biodegradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.05.007>
- Östberg, T.L., Jonsson, A.P., Lundström, U.S., 2007b. Enhanced degradation of n-hexadecane in diesel fuel contaminated soil by the addition of fermented whey. *Soil Sediment Contam.* 16, 221–232. <https://doi.org/10.1080/15320380601169425>
- Panikov, N.S., 2016. Kinetics of microbial processes. In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09733-5>

- Pavlova, M., 2017. Effects of residual biomass use in agriculture. *Trakia J. Sci.* 15,330-337. <https://doi.org/10.15547/tjs.2017.s.01.058>
- Pirog, T.P., Konon, A.D., and Savenko, I.V., 2015. Microbial surfactants in environmental technologies. *Biotechnol. Acta*, 8, 21–39. <https://doi.org/10.15407/biotech8.04.021>
- Purwanti, I.F., Abdullah, S.R.S., Hamzah, A., Idris, M., Basri, H., Mukhlisin, M., Latif, M.T., 2015. Biodegradation of diesel by bacteria isolated from *Scirpus mucronatus* rhizosphere in diesel-contaminated sand. *Adv. Sci. Lett.* 21,140-143. <https://doi.org/10.1166/asl.2015.5843>
- Purwanti, I.F., Kurniawan, S.B., Titah, H.S., Tangahu, B.V., 2018. Identification of acid and aluminium resistant bacteria isolated from aluminium recycling area. *Int. J.Civ. Eng. Technol.* 9, 945-954
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 3, 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Sari, G.L., Trihadiningrum, Y., Wulandari, D.A., Pandebesie, E.S., Warmadewanthi, I.D.A.A., 2018. Compost humic acid-like isolates from composting process as bio-based surfactant: properties and feasibility to solubilize hydrocarbon from crude oil contaminated soil. *J. Environ. Manag.* 225, 356e363. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.010>
- Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A., 2010. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 28, 4, 436–50. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>
- Singh, S., Kumar V., Singh, S., Dhanjal, D.S., Datta, S., Sharma, D., Singh, N. H., Singh, J., 2020. 16 - Biosurfactant-based bioremediation. Editor(s): Vimal Chandra Pandey, Vijai Singh, *Bioremediation of Pollutants*, Elsevier, 333-358, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00016-8>
- Streck, E.V., Kampf, N., Dalmolin, R.S.D., Klamt, E., Nascimento, P.C., Schneider, P., Giasson, E., Pinto, L.F.S., 2008. Soils from Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil. (in Portuguese)
- Thomé, A., Cecchin, I., Reginatto, C., Colla, L.M., Reddy, K.R., 2017. Biostimulation and rainfall infiltration: influence on retention of biodiesel in residual clayey soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 9594-9604. doi: 10.1007/s11356-017-8670-9
- Thomé, A., Reginatto, C., Cecchin, I., Colla, LM, 2014. Bioventing in a residual clayey soil contaminated with a blend of biodiesel and diesel oil. *J. Environ. Eng.* 140, 06014005. doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000863
- Titah, H.S., Pratikno, H., Moesriati, A., Imron, M.F., Putera, R.I., 2018. Isolation and screening of diesel degrading bacteria from ship dismantling facility at Tanjungjati, Madura, Indonesia. *J. Eng. Technol. Sci.* 50, 99. <https://doi.org/10.5614/j.eng.technol.sci.2018.50.1.7>
- USEPA, US, 2007. Environmental Protection Agency. Method 3350C. Online at <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3550c.pdf>
- Wu, B., Lan, T., Lu, D., Liu, Z., 2014. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 1501-1509. <https://doi.org/10.1039/C3EM00731F>

## 6 CONCLUSÃO GERAL

O comportamento dos biossurfactantes produzidos no próprio solo em processos de biorremediação ainda é pouco compreendido. Embora seja conhecido o efeito positivo desses biocompostos em termos de eficiência de remoção de poluentes, em alguns casos, a taxa de degradação é muito baixa ou mesmo inibida. A principal razão para isso talvez seja a inconsistência entre a função pretendida dos biossurfactantes nos processos de biorremediação (aumentando a biodisponibilidade dos poluentes) e seu papel na comunidade microbiana autóctone, que vai além dos limites da biorremediação.

Com relação ao efeito da adição de biossurfactantes (surfactina e ramnolipídio) no solo verificou-se que não foi um fator significativo, nas concentrações utilizadas, e não interferiu na adsorção do contaminante. Assim, pode-se dizer que a inserção dos biossurfactantes em quantidade suficiente para uma biorremediação efetiva não afeta a percolação do contaminante no solo.

Quanto a aplicação das técnicas de bioestimulação e/ou bioaugmentação com o objetivo de avaliar a biodegradação do óleo diesel, evidenciando a produção de biossurfactantes no solo por meio da tensão superficial, verificou-se que a maior taxa de remoção de óleo diesel obtida pela aplicação da biorremediação foi de 61,46% em 60 dias, resultado 28,04% maior, quando comparado com a técnica de atenuação natural. A produção de biossurfactantes no solo, avaliada pela medida da tensão superficial dos extratos de solo, apresentou redução da tensão superficial para os tratamentos de bioaugmentação e bioestimulação (11,82%), indicando a liberação de biossurfactantes no meio. Esta tendência não foi observada nos tratamentos de atenuação natural e controle.

Desse modo, demonstramos que esses temas estão intimamente relacionados e fornecem um melhor entendimento dos efeitos dos biossurfactantes durante o processo de biorremediação. Além disso, os resultados até agora indicam que a medida da tensão superficial ao longo do processo é de suma importância e apresentam um cenário a respeito da produção de biossurfactantes.

Ainda, como trabalhos futuros, há a necessidade do desenvolvimento de mais métodos para medir e monitorar as concentrações de biossurfactante, uma vez que tais métodos são cruciais para o sucesso da aplicação da biorremediação em áreas contaminadas. Estudos futuros não devem se concentrar apenas em uma abordagem centrada na eficiência, mas também na elucidação das complexas interações entre a matriz do solo, biossurfactantes, microrganismos e contaminantes.



## 7 REFERÊNCIAS

- Ahmed, F., Fakhruddin, A.N.M., 2018. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour.* 11, 1-7. doi:10.19080/IJESNR.2018.11.555811
- Aljuboury, D.A.D.A., Palaniandy, P., Abdul Aziz, H.B., Feroz, S., 2017. Treatment of petroleum wastewater by conventional and new technologies - a review. *Glob. Nest J.* 19, 439-452
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J., James Beck, A., 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions. *Environ. Pollut.* 141, 459-468. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.066
- Araujo, H.W.C., Andrade, R.F.S., Montero-Rodriguez, D., Rubio-Ribeaux, D., Alves da Silva, C.A., Campos-Takaki, G.M., 2019. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microb. Cell. Fact.* 18, 2. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., 2016. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 180. doi:10.1007/s11274-016-2137-x
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2015. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochem. Eng. J.* 101, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>
- Chaprão, M.J., Ferreira, I.N.S., Correa, P.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Silva, E.J., Sarubbo, L.A., 2015. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electron. J. Biotechn.* 18, 471–479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.005>.
- Decesaro, A. 2016. Produção de biossurfactantes a partir de resíduos da indústria de laticínios para aplicação em processos de biorremediação. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil. <http://tede.upf.br:8080/jspui/handle/tede/1424>
- Decesaro, A., Machado, T.S., Cappellaro, A.C., Rempel, A., Margarites, A.C., Reinher, C.O., Eberlin, M.N., Zampieri, D., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Biosurfactants production using permeate from whey ultrafiltration and the bioproduct recovery by membrane separation process. *J. Surfactants Deterg.* 23, 539–551. doi:10.1002/jsde.12399
- Franzetti, A., Caredda, P., Ruggeri, C., La Colla, P., Tamburini, E., Papacchini, M., Bestetti, G., 2009. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere*, 75, 801–807. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.052
- Gudiña, E.J., Rangarajan, V., Sen, R., Rodrigues, L.R., 2013. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 667 – 675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.002>
- Imron, M.F., Kurniawan, S.B., Ismail, N., Abdullah, S.S., 2020. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: A review. *J. Clean. Prod.* 251, 119716. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119716>

- Jain, P.K., Gupta, V.K., Gaur, R.K., Lowry, M., Jaroli, D.P., Chauhan, U.K., 2011. Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. *Res. J. Environ. Toxicol.* 5, 1-26. doi:10.3923/rjet.2011.1.26
- Jimoh, A.A., Lin, J., 2020. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotox. Environ. Safe.* 184, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Lawniczak, L., Marecik, R., Chrzanowski, L., 2013. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2327–2339. doi:10.1007/s00253-013-4740-1
- Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R., 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: an overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ. Technol. Innov.* 10, 175-193. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>
- Machado, T.S., Decesaro, A., Cappellaro, A.C., Machado, B.S., Reginato, K.V S., Reineh, C.O., Thomé, A., Colla, L.M., 2020. Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil. *Ecotox. Environ Safe.* 201, 110798. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110798>
- Mani, D., Kumar, C., 2014. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 843–872
- Mnif, I., Mnif, S., Sahnoun, R., Maktouf, S., Ayedi, Y., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 14852–14861. doi:10.1007/s11356-015-4488-5
- Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Procha, S., Lal, S., 2015. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus* 4, 4. doi:10.1186/2193-1801-4-4
- Singh, K., Chandra, S., 2014. Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: a Review. *Pak. J. Biol. Sci.* 17, 1-8. doi:/10.3923/pjbs.2014.1.8
- Speight, J.G., 2015. Handbook of petroleum product analysis: second edition. *Handbook of Petroleum Product Analysis: Second Edition.* doi:10.1002/9781118986370
- Vidonish, J.E., Zygourakis, K., Masiello, C.A., Sabadell, G., Alvarez, P.J.J., 2016. Thermal treatment of hydrocarbon-impacted soils: a review of technology innovation for sustainable remediation. *Engineering.* 2, 426-437. <http://dx.doi.org/10.1016/J.ENG.2016.04.005>
- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C., Cheng, S.S., 2008. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation - Effects of pH and ammonium addition. *J. Hazard. Mater.* 164, 1045–1050. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.006
- Wilton, N., Lyon-Marion, B.A., Kamath, R., McVey, K., Pennell, K.D., Robbat Jr. A., 2018. Remediation of heavy hydrocarbon impacted soil using biopolymer and polystyrene foam beads. *J. Hazard. Mater.* 349,153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.041>
- Zhang, L., Yan, C., Guo, Q., Zhang, J., Ruiz-Menjivar, J., 2018. The impact of agricultural chemical inputs on environment: global evidence from informetrics analysis and visualization. *Int. J. Low Carbon Technol.* 13, 338–352. <https://doi.org/10.1093/ijlct/cty039>

Zhang, W., Chen, L., Liu, D., 2012. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1305–1314. doi: 10.1007/s00253-011-3454-5

Zhao, G., Sheng, Y., Wang, C., Yang, J., Wang, Q., Chen, L., 2018. In situ microbial remediation of crude oil-soaked marine sediments using zeolite carrier with a polymer coating. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.030>

## 8 ANEXOS

# Biosurfactants Production Using Permeate from Whey Ultrafiltration and Bioproduct Recovery by Membrane Separation Process<sup>1</sup>

## Abstract

The management of whey is a challenge for dairy products where the volume produced is remarkable. This problem is minimized through membrane separation processes (MSP) to obtain whey protein concentrate, which has high added value. However, a permeate effluent stream is still generated that is composed of lactose, vitamins, and minerals, which can serve as raw material for the production of biotechnological compounds. Thus, this study aimed to produce biosurfactants using the permeate from whey ultrafiltration as part of the culture media of the bioprocess, to recover the biosurfactant produced using MSP, and to identify the biocompound. The production was carried out using *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus pumilus*. The variables nitrogen source (urea or ammonium sulfate), nitrogen source concentration (0.5% or 1.0%), inducer (soybean oil or biodiesel), inducer concentration (1% or 2%), and the addition of micronutrients (with or without) were studied using a fractional factorial experimental design 2<sup>5</sup>-1 IV. In the fermentation processes, it was possible to verify the biosurfactant production through the reduction of surface tension, obtaining a minimum value of 35.07 mN/m for *B. methylotrophicus* and 26.02 mN/m for *B. pumilus*. Recovery via MSP was an efficient strategy for biosurfactant purification, which was concentrated in the fraction of the retentate. We produced a high-value-added biocompound identified as surfactin, valuing the permeate residue from whey ultrafiltration.

**Keywords:** Microbial growth; Fermentation; Whey; Surfactin; Microfiltration; Surface tension; Emulsification

**doi:** 10.1002/jsde.12399

---

<sup>1</sup> Andressa Decesaro, Thaís Strieder Machado, Ângela Carolina Cappellaro, Alan Rempel, Ana Cláudia Margarites, Christian Oliveira Reinehr, Marcos Nogueira Eberlin, Davila Zampieri, Antônio Thomé, Luciane Maria Colla

# Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil<sup>1</sup>

## Abstract

Despite constant progress in the understanding of the mechanisms related to the effects of biosurfactants in the bioremediation processes of oily residues, the possibility of antagonist effects on microbial growth and the production in situ of these compounds must be elucidated. The aims of this work were a) to evaluate the effects of the addition of a homemade biosurfactant of *Bacillus methylotrophicus* on the microbial count in soil in order to determine the possibility of inhibitory effects, and b) to accomplish biostimulation using media prepared with whey and bioaugmentation with *B. methylotrophicus*, analyzing the effects on the bioremediation of diesel oil and evidencing the in situ production of biosurfactants through effects on surface tension. The homemade bacterial biosurfactant did not present inhibitory effects acting as a biostimulant until 4000 mg biosurfactant/kg of soil. The biostimulation and bioaugmentation presented similar better results ( $p > 0.05$ ) with the degradation of oil (~60%) than natural attenuation due to the low quantities of biostimulants added. For bioaugmented and biostimulated soils, a decrease of surface tension between 30 and 60 days was observed, indicating the production of tensoactives in the soil, which was not observed in natural attenuation or a control treatment.

**Keywords:** Adsorption; Bacterial surfactant; Biodegradation; Stimulating effect; Hydrocarbon Tensoactive

**doi:** 10.1016/j.ecoenv.2020.110798

---

<sup>1</sup> Thaís Strieder Machado, Andressa Decesaro, Ângela Carolina Cappellaro, Bruna Strieder Machado, Kimberly van Schaik Reginato, Christian Oliveira Reinehr, Antônio Thomé, Luciane Maria Colla

## Chapter 1

# Waste Biomass and Blended Bioresources in Biogas Production<sup>1</sup>

### Abstract

Global energy demand is getting higher, and most of this energy is produced through fossil fuels. Recent studies report that anaerobic digestion is an efficient alternative to produce biogas. Moreover, the transformation of complex organic materials into a source of clean and renewable energy reduces the emission of greenhouse gases and can produce as by-product a high-value fertilizer for growing crops. The anaerobic co-digestion is an option to solve the disadvantages of single substrate digestion system, being the chemical composition and properties of the substrates, the operating parameters (temperature, pH, charge rate, etc.), the biodegradability, bioaccessibility, and bioavailability, important parameters to be optimized. The main materials that could be used for biogas production are waste from cities, residues from the production of other biofuels, agro-industrial waste in general, agricultural crops, straws, or microalgae biomass obtained by cultivation in wastewater. However, some of these materials, specially raw materials, need to be treated to improve the biogas production. The aim of this chapter is to review the main materials that could be used for biogas production and the factors to optimize the production.

**Keywords:** Biogas; Co-digestion; Pretreatments

**doi:** 10.1007/978-3-030-10516-7\_1

---

<sup>1</sup> Luciane Maria Colla, Ana Cláudia Freitas Margarites, Andressa Decesaro, Francisco Gerhardt Magro, Naiara Kreling, Alan Rempel, Thaís Strieder Machado

## Chapter 9

### Association of bioethanol and biogas for environmental impact mitigation<sup>1</sup>

#### Abstract

The need to replace the current energy matrix based on the use of fossil fuels with alternative biofuels has motivated studies to discover new sources of raw materials as well as to optimize production processes. Parallel studies have been carried out to determine the environmental impacts of biofuel production, making it possible to compare them with the impacts of currently used fuels, and to identify the best alternative sources of raw materials, such as the processes and biofuels produced. We aimed to conduct a survey of the environmental impacts generated in the production of bioethanol and biogas, as well as to verify the methods that have been proposed to mitigate the environmental impacts generated when biofuels are produced isolated or in associated processes. Some of the environmental impacts resulting from the production of bioethanol and biogas originated in the production of raw materials due to the use of arable land, generating food insecurity, as well as the possibility of the acidification of soils and the eutrophication and emission of greenhouse gases. In addition, when the raw materials need to be pretreated to make their chemical structures available for the microbiological metabolism, environmental impacts can again occur due to the greater use of energy, water and chemicals. In relation to the use of biofuels, the addition of bioethanol in blends of other fuels or the substitution of petroleum fuels with biogas can reduce the impacts, mainly with regard to the emission of gases. The association of bioethanol and biogas processes can mitigate many of the aforementioned environmental effects, along with the use of alternative raw materials, such as microalgae and macroalgae, which were considered as promising alternatives. Studies that evaluate the production processes on a case-by-case basis are necessary in order to measure the possible impacts of alternative biofuels.

**Keywords:** bioenergy use, environmental aspects, life cycle assessment (LCA), production process for biofuels, raw materials

**ISBN:** 978-1-53615-719-2

---

<sup>1</sup> Luciane Maria Colla, Alan Rempel, Andressa Decesaro, Anne Luize Lupatini Menegotto, Eliane Colla, Francisco Gerhardt Magro, Naiara Kreling, Thaís Strieder Machado





**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 005321 0

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92034321000125

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Sociedade com intuito não econômico

Endereço: campus universitário bairro são josé

Cidade: Passo Fundo

Estado: RS

CEP: 99050-000

País: Brasil

Telefone: 5132321718

Fax:

Email:

## Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE OBTENÇÃO DO BIOSSURFACTANTE SURFACTINA

Resumo: RESUMO

MÉTODO DE OBTENÇÃO DO BIOSSURFACTANTE SURFACTINA  
A presente invenção pertence ao setor tecnológico dos biossurfactantes e se refere, mais especificamente, a um método de obtenção de surfactina, um biossurfactante, a partir do uso da bactéria *Bacillus methylotrophicus* em meio de cultivo composto por soro de leite. O soro de leite é um resíduo agroindustrial, gerado pelas indústrias de laticínios, que contém elevadas concentrações de nutrientes, tais como proteínas, lactose e sais minerais. Devido a sua elevada carga orgânica, ocorrem dificuldades no tratamento deste resíduo, acarretando em alto potencial poluente. No entanto, a presente invenção faz uso desse resíduo a fim de servir de meio de cultura para a bactéria *Bacillus methylotrophicus* na produção de surfactina, dada a necessidade de redução de custos para produzir este tipo de biocomposto. Uma vez que os biossurfactantes produzem alterações na tensão superficial dos fluidos, foi possível observar redução da tensão superficial no meio de cultura de 40,88 mN/m para 27,33 mN/m, indicando a produção de biossurfactante em meio com soro de leite suplementado com fonte de nitrogênio, indutor oleoso e micronutrientes em fermentação submersa.

Figura a publicar: Fig.1

## Dados do Procurador

---

### Procurador:

Nome ou Razão Social: Milton Lucídio Leão Barcellos

Numero OAB: 43707RS

Numero API: 838

CPF/CNPJ: 68966814034

Endereço: Av. Plínio Brasil Milano, 757, 13º andar, Bairro Higienópolis

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90520-002

Telefone: (51) 3226 0624

Fax: (51) 3224 7896

Email: milton@leao.adv.br

### Escritório:

Nome ou Razão Social: LEÃO PROPRIEDADE INTELECTUAL

CPF/CNPJ: 88062427000165

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2017 às 14:22, Petição 870170017366

Dados do Inventor (72)

---

Inventor 1 de 5

Nome: THAÍS STRIEDER MACHADO

CPF: 00352617063

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Estrada do Trigo, nº 801, ap. 305D, Bairro São José

Cidade: Passo Fundo

Estado: RS

CEP: 99052-160

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 5

Nome: ALAN REMPEL

CPF: 01830525018

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Avenida Brasil, nº 377, ap. 504, Bairro Centro

Cidade: Passo Fundo

Estado: RS

CEP: 99010-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 5

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2017 às 14:22, Petição 870170017366

Nome: ANDRESSA DECESARO

CPF: 81733178015

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Valeriano Ughini, nº 468, Bairro São Cristóvão

Cidade: Tapejara

Estado: RS

CEP: 99950-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 5

Nome: LUCIANE MARIA COLLA

CPF: 02309369977

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Avenida Brasil Oeste, nº 1152, ap. 802, Bairro Boqueirão

Cidade: Passo Fundo

Estado: RS

CEP: 99025-003

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 5

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2017 às  
14:22, Petição 870170017366

Nome: ÂNGELA CAROLINA CAPPELLARO

CPF: 02122080043

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Saldanha Marinho, nº 527, ap. 101, Bairro Centro

Cidade: Passo Fundo

Estado: RS

CEP: 09010-150

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

#### Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Documento de Cessão	Autor.Cessão de Inv..pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	Guia Depósito PI.pdf
Procuração	Procuração.pdf
Estatuto	Estatuto FUPF - arquivo menor.pdf
ATA	ATA CD nº 1172 - Registrada.pdf

#### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

#### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/03/2017 às 14:22, Petição 870170017366



**UPF**  
UNIVERSIDADE  
DE PASSO FUNDO

UPF Campus I - BR 285, São José  
Passo Fundo - RS - CEP: 99052-900  
(54) 3316 7000 - [www.upf.br](http://www.upf.br)