

LIPÍDIOS MICROALGAIS UTILIZADOS COMO BIOSURFACTANTES EM PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DE DIESEL E BIODIESEL EM SOLO

MICROALGAL LIPIDS AS BIOSURFACTANTS IN A BIOREMEDIATION OF DIESEL AND BIODIESEL IN SOIL

Roberta Schmitz¹, Andressa Decesaro², Gabriela Santeti³, Christian Oliveira Reinehr⁴, Antônio Thomé⁵, Luciane Maria Colla⁶

¹Mestre em Engenharia Civil e Ambiental, Engeovale Eficiência em Meio Ambiente
E-mail: roberta.schmitz@bol.com.br.

²Engenheira Ambiental, discente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Passo Fundo, RS. E-mail: andressa_decasaro@hotmail.com.

³Discente do Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, RS
E-mail: gz_gabriela@hotmail.com.

⁴Professor Doutor, docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, RS. E-mail: reinehr@upf.br.

^{5,6}Professores Doutores, docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Passo Fundo, RS

⁵E-mail: thome@upf.br

⁶E-mail: lmcolla@upf.br.

RESUMO

Nos últimos anos tem crescido a preocupação com o meio ambiente. Neste contexto incluem-se a busca de alternativas para a menor geração de poluentes, bem como para descontaminação de locais contaminados com resíduos que podem ser tóxicos ao meio ambiente e a população. O objetivo deste trabalho foi a utilização de lipídios microalgais como biossurfactantes, na descontaminação de um solo contaminado com diesel ou biodiesel, comparando-se com a técnica de atenuação natural. Os lipídios foram extraídos da microalga *Spirulina platensis* e adicionados a solos contaminados com 4 % de diesel ou biodiesel. A biodegradação foi acompanhada por determinação de óleos e graxas e a atividade microbiana pela técnica de evolução de CO₂. Os lipídios microalgais demonstraram sua potencial aplicação na biorremediação de resíduos oleosos, uma vez que se obteve 81,9 % de biodegradação do biodiesel e 81,7 % do diesel, bem maior quando comparada com 54,36 % e 30,09 % nos ensaios de atenuação natural, com o contaminante diesel ou biodiesel respectivamente, em 60 dias de ensaio. A evolução de CO₂, também apresentou resultados elevados de CO₂ acumulado nos ensaios adicionados do biossurfactante. No ensaio adicionado de biodiesel com biossurfactante, o acúmulo de CO₂ foi de 1.341,65 mg ao longo dos 60 dias, comparado com 775,3 mg de CO₂ no ensaio com diesel e biossurfactante, enquanto que nos ensaios com a técnica de atenuação natural a evolução de CO₂ foi de 184,51 mg para diesel e 246,80 mg para biodiesel. **Palavras-chave:** Biodegradação, *Spirulina platensis*, lipídios, evolução de CO₂.

ABSTRACT

The concern with the environment has been growing in last years. These contexts include the search for alternatives to low the generation of pollutants, as well as decontamination of sites contaminated with hazardous wastes that may be toxic to the environment and the population as a whole. The aim of this work was the use of microalgal lipids as biosurfactants in the decontamination of soil contaminated with diesel and biodiesel, compared with natural attenuation. Lipids were extracted of the *Spirulina platensis* biomass and added to diesel or biodiesel contaminated soils. The biodegradation was accompanied by determination of oil and grease and microbial activity by the technique of CO₂ evolution. The microalgal lipids demonstrated its potential in the bioremediation of oil residues, since there was obtained 81.9% and 81.7% of biodiesel and diesel biodegradation respectively, greater than the values obtained in natural attenuation, of 54.36% and 30.09% with diesel or biodiesel respectively, at 60 days of bioremediation. The evolution of CO₂ also showed high results of accumulated CO₂ in the tests added of biosurfactant. In the assay of biodiesel added of biosurfactant, cumulative CO₂ was 1341.65 mg at 60 days, compared to 775.3 mg of CO₂ in assay realized with biosurfactant and diesel, while in trials with natural attenuation, the evolution of CO₂ was 184.51 mg and 246.80 mg for diesel to biodiesel.

Keywords: Biodegradation, *Spirulina platensis*, lipids; CO₂ evolution.

1 – INTRODUÇÃO

Os processos biológicos são uma tecnologia promissora para a remoção de contaminantes por serem fundamentados em métodos naturais e relativamente simples, sendo menos agressivos e mais adequados para a

manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados a outros processos (BENTO *et al.*, 2005; MATHEW *et al.*, 2006).

A biorremediação é um processo de tratamento ativo que usa micro-organismos para degradar e transformar os contaminantes do solo, sedimentos e resíduos em

compostos simples (MENEGETTI, 2007). Essa ação microbiana é capaz de modificar ou decompor o composto original em formas mais simples, menos tóxicas ou atóxicas, sendo que a meta final é a conversão de resíduos orgânicos em biomassa e subprodutos inertes do metabolismo microbiano como o CO₂, CH₄ e sais orgânicos (CORSEUIL, 1994), ou seja a mineralização do contaminante (SEMPLE; REID; FERMOR, 2001). A atenuação natural é um processo de biorremediação que ocorre sem a intervenção humana, sendo uma forma passiva de remediação (ROSADO, 2005). A atenuação natural consiste em processos que ocorrem naturalmente, resultando na contenção, transformação ou destruição dos contaminantes (CORSEUIL, 1994).

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana cometabolizante, que também atua na biodegradação de certos componentes do petróleo e de outros resíduos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Os compostos de carbono da matéria orgânica servem como fonte de energia para os organismos do solo, portanto, a atividade desses está diretamente relacionada à disponibilidade de carbono, além dos outros macro e micro nutrientes. Os organismos participam de diversas reações e processos que ocorrem no solo, sendo sua existência de fundamental importância (MEURER, 2006).

A capacidade de degradar contaminantes é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras (TRINDADE, 2002), sendo de fundamental importância o conhecimento de como a biodiversidade é desenvolvida e mantida nas comunidades microbianas naturais a fim de auxiliar nos processos de biorremediação, de maneira que se possa manipular e controlar essa diversidade, com intuito de melhorar e estimular as taxas de degradação de compostos, como hidrocarbonetos, em ambientes contaminados (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 1999). As tecnologias de biorremediação aumentam o crescimento da população microbiana e criam condições ótimas para o máximo de degradação possível (MOREIRA; SIQUEIRA 2002; BENTO *et al.*, 2005).

Uma biorremediação bem sucedida requer um entendimento dos fatores específicos do local que limitem somente as biotransformações desejáveis e que não resultem em consequências não intencionais, como a produção de metabólitos tóxicos, condições ambientais adversas tais como um pH e temperatura extremos que podem inibir atividades microbianas específicas (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

Os biossurfactantes são moléculas de origem lipídica com alto potencial de aplicação ambiental devido às suas características específicas como biodegradabilidade e atoxicidade (NITSCHKE; PASTORE, 2002). São compostos tensoativos produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras e apresentam características surfactantes iguais aos produzidos sinteticamente (DESAI; BANAT, 1997). Estes compostos de superfície ativa aumentam a superfície hidrofóbica de substratos insolúveis em água e aumentam a sua

biodisponibilidade, isto é, o micro-organismo consegue utilizar esse composto como nutriente, aumentando assim o crescimento de bactérias e a taxa de biorremediação (RON; ROSENBERG, 2002; PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011). Os micro-organismos produzem biossurfactantes dispersantes de hidrocarbonetos de diversificada natureza química e tamanho molecular. Esses compostos tem sido muito utilizados na área ambiental, especialmente na biorremediação de locais contaminados com resíduos oleosos (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA 2000; MATSUURA, 2004).

A composição lipídica da biomassa microalgal é composta tipicamente por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados, quanto mono ou poli-insaturados. Os lipídios microalgais podem ser classificados em lipídios neutros e polares, sendo polares os glicolipídios e fosfolipídios. Estruturas semelhantes, quando produzidas tem se apresentado como biossurfactantes ativos. Uma vez que não há relatos do uso de lipídios microalgais como biossurfactantes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade do lipídio extraído da microalga *Spirulina platensis* como biossurfactante lipídico na biorremediação de solos contaminados com diesel ou biodiesel.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são apresentados os procedimentos para a realização do estudo. Primeiramente, foram extraídos os biossurfactantes lipídicos da microalga *Spirulina platensis*, para posterior utilização nos ensaios de biorremediação de solo contaminado com diesel e biodiesel.

2.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes microalgais foram extraídos a partir da biomassa seca de *Spirulina platensis*, cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade de Rio Grande – FURG. A extração foi realizada utilizando-se do método de extração de lipídios microalgais, descrito por Folch e Lees (1957), adaptado. Utilizou-se um Ultrassom marca Ultrasonic Cleoner Thornton T1440 e Rotaevaporador marca Fisatom, modelo 802. A Equação 1 foi utilizada para cálculo do percentual de lipídios obtidos da biomassa.

$$\% \text{ lipídio} = \frac{P_1 - P_2}{P_0} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

P₂ = peso balão (g)

P₁ = peso balão + lipídio (gramas)

P₀ = biomassa de *Spirulina* (gramas)

2.2 Atividade emulsificante dos lipídios microalgais

Após a determinação do percentual de lipídios, os lipídios foram ressuspensos em hexano e avolumados em balão volumétrico de 10 mL.

Para a determinação da atividade emulsificante (AE) foram utilizados tubos de ensaio com tampa de rosca (10

cm x 0,3 cm), nos quais foram adicionados 3,0 mL de água destilada, 2 mL de óleo de milho e 1,0 mL do extrato lipídico em hexano. Para os brancos, foram utilizados 3,0 mL de água destilada, 2 mL de óleo de milho e 1,0 mL de hexano. Essas misturas foram agitadas em agitador Marconi MA-162, velocidade 7, por 90 s.

Após 60 min de repouso verificou-se a absorvância do meio emulsificado em espectrofotômetro (T60 – UV Visible Spectrophotometer) a 610 nm para determinação da atividade emulsificante O/A ($UE/mg_{lipídio}$), utilizando-se a Equação 2.

$$AE_{O/A} = \frac{(ABS_{amostra} - ABS_{branco})}{M_{lipídio}} \cdot D \quad (2)$$

Em que:

$AE_{O/A}$ = Atividade emulsificante

$ABS_{amostra}$ = Absorbância da amostra

ABS_{branco} = Absorbância do branco

$M_{lipídio}$ = Massa de lipídio

D = diluição

Para a determinação da AE A/O foi realizada a leitura das emulsões, após 24 h, com a utilização de paquímetro eletrônico digital Vonder, obtendo-se as leituras para os 4 raios do tubo da altura total de líquido e a altura da camada emulsionada. O índice de emulsificação (E_{24}) foi obtido por meio da Equação 3 descrita por Cooper e Goldenberg (1987).

$$E_{24} = \frac{H_{emulsão}}{H_{total}} \cdot 100 \quad (3)$$

Em que:

E_{24} = índice de emulsificação (%)

$H_{emulsão}$ = altura da camada de emulsão

H_{total} = altura da camada total

A partir do E_{24} obtido foi calculada a AE A/O ($UE/mg_{lipídio}$) de cada ensaio por meio da utilização da Equação 4.

$$AE_{A/O} = \frac{(E_{amostra} - E_{branco})}{M_{lipídio}} \cdot D \quad (4)$$

Em que:

$AE_{A/O}$ = Atividade emulsificante

$E_{amostra}$ = E_{24} da amostra

E_{branco} = E_{24} do branco

D = diluição

$M_{lipídio}$ = Massa de lipídio

2.3 Ensaio de biorremediação

Os lipídios microalgais foram utilizados em um processo de biorremediação de solo contaminado com 4 % de diesel ou 4 % biodiesel (B100), em comparação com a técnica de atenuação natural, durante 60 dias.

Os ensaios foram montados em frascos herméticos com 300 g de solo, contaminados com 4 % diesel ou biodiesel e adicionados de 0,5 % de lipídios microalgais como biossurfactantes. O delineamento experimental utilizado está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental do ensaio de biorremediação

Nº	Experimento	Conteúdo
1	Controle	Solo
2	Atenuação/Diesel	Solo+Diesel
3	Atenuação/Biodiesel	Solo+Biodiesel
4	Biossurfactante/Diesel	Solo+Diesel+Lipídio
5	Biossurfactante/Biodiesel	Solo+Biodiesel+Lipídio
11	Branco	

O ensaio em branco (experimento 11) foi constituído do frasco vazio a fim de se avaliar a absorção de CO_2 constituinte do ar na ausência de solo dentro do frasco, na técnica de evolução de CO_2 . Todos os ensaios foram realizados em duplicata, sendo os ensaios 6 a 10 as réplicas dos ensaios 1 a 5. Na Figura 1 são apresentados os ensaios montados.

Figura 1 – Ensaios de biorremediação de solo contaminado com diesel e biodiesel



O solo utilizado no ensaio foi coletado no Centro Tecnológico de Engenharia Civil, Ambiental e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo (CETEC/UPF), foi utilizado por se tratar de um solo já estudado em demais pesquisas. Este solo é classificado pedologicamente como Latossolo Vermelho distrófico húmico (STRECK, 2008). Do ponto de vista geotécnico, é classificado como CH, ou argila de alta plasticidade. O solo apresenta pH ácido, alto teor de argila, baixo teor de matéria orgânica e baixa CTC, típica de solos com predominância do argilo-mineral caulinita (STRECK, 2008), conforme observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização geotécnica e física do solo

Parâmetro	Valor
Argila (%)	68
Silte (%)	5
Areia (%)	27
Limite de liquidez (%)	53,0
Limite de plasticidade (%)	42,0
Peso real dos grãos (kN/m^3)	26,7
Umidade natural (%)	34
Peso específico natural (kN/m^3)	16,3
Índice de vazios	1,19
Grau de saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
pH	5,4
Matéria orgânica (%)	<0,8
Condutividade hidráulica (cm/s)	$1,39 \times 10^{-3}$

Fonte: Prietto *et al.* (2010).

Os solos argilosos, como o solo deste estudo, quando contaminados por petróleo, possuem algumas características que podem limitar a eficácia do processo de biodegradação por apresentar baixa permeabilidade, podendo interferir diretamente tanto na difusão de oxigênio (fundamental ao processo aeróbio de degradação) quanto na incorporação de nutrientes (BAPTISTA; RIZZO, 2004). Teoricamente solos argilosos possuem baixa permeabilidade, como citado na literatura, porém em Latossolos, que apresentam uma boa estruturação, a quantidade de macroporos é suficiente para que haja uma permeabilidade relativamente rápida de água.

A umidade inicial do solo no início dos ensaios foi de 34% (máxima capacidade de absorção de campo).

2.4 Determinações analíticas

Foram realizadas determinações no teor de umidade dos solos durante o processo de biorremediação, bem como o acompanhamento da evolução de CO₂ e a avaliação da biodegradação por meio da determinação de óleos e graxas. As respectivas metodologias encontram-se descritas nas seções subsequentes.

2.4.1 Determinação do teor de umidade

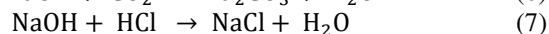
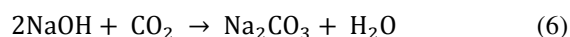
As determinações de umidade em base seca dos ensaios foram realizadas no tempo inicial, 30 e 60 dias, por meio da Equação 5, segundo a ABNT NBR 6457:1986.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{cápsula+solo úmido}) - (\text{cápsula+solo seco})}{(\text{cápsula +solo seco}) - (\text{cápsula})} \cdot 100 \quad (5)$$

2.4.2 Determinação da evolução de CO₂

Para avaliação da evolução de CO₂ nos ensaios utilizou-se a metodologia de respirometria, adaptado do método respirométrico de Bartha descrito pela ABNT NBR 14.283:1999.

A medida da geração de CO₂ foi realizada em todos os ensaios, inclusive no ensaio controle. O volume da solução de HCl 0,1 N, gasto para atingir o pH capaz de mudar a coloração do indicador Fenolftaleína da cor rósea para a incolor, foi utilizado no cálculo da quantidade de CO₂ produzido, comparando-se com o volume gasto para titular o Branco (NaOH incubado em frasco sem a presença de solo). Esse cálculo é possível, pois o CO₂ resultante da biodegradação reage com o NaOH, no interior do frasco, formando Na₂CO₃. Quando a mistura de Na₂CO₃ e excesso de NaOH é adicionada à solução de BaCl₂ 1,0 N, ocorre reação do Na₂CO₃ e do BaCl₂ formando o precipitado BaCO₃, sequestrando o Carbonato e garantindo que o HCl reaja apenas com o NaOH excedente, permitindo o cálculo da quantidade de CO₂ produzida conforme as Equações 6 e 7 (COSTA, 2009).



Com o volume de HCl gasto na titulação é possível saber, por estequiometria, a quantidade de CO₂ gerada

pelos micro-organismos do solo em cada um dos tempos determinados, conforme Equação 8.

$$C - \text{CO}_{2(\text{mg})} = (B - V) \cdot M \cdot f \cdot 6 \cdot (V_1 \cdot V_2) \quad (8)$$

Em que:

B= Volume de HCl gasto no branco (mL)

V = Volume de HCl gasto na amostra (mol/L)

M = Concentração real do HCl (mol/L)

6 = Massa atômica do C(12) dividido pelo número de mols de CO₂ que reagem com o NaOH

V1 = Volume de NaOH usado na captura de CO₂ (mL)

V2 = Volume de NaOH usado na titulação (mL)

F = fator de correção do HCl

C-CO₂ = Carbono proveniente de Dióxido de Carbono

2.4.3 Avaliação da biodegradação dos contaminantes

A análise de óleos e graxas foi realizada para determinar o percentual de degradação do contaminante pelos micro-organismos presentes no solo.

A análise gravimétrica de óleos e graxas foi realizada seguindo a metodologia de extração por ultrassom da USEPA 3550B (1996). O ultrassom auxilia na remoção de substâncias voláteis e semi-voláteis do solo, podendo esta ser quantificada. O cálculo do teor residual e do percentual de degradação foi calculado por meio da Equação 9 e 10, respectivamente.

$$\text{Teor residual (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \cdot 100 \quad (9)$$

Em que:

P₀ = Quantidade de amostra de solo em peso seco utilizada na análise (g)

P₁ = Peso do balão de fundo chato (g)

P₂ = Peso do balão de fundo chato mais a mistura B100 extraída do solo contaminado (g).

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{\% \text{OG}_{\text{inicial}} - \% \text{OG}_{\text{final}}}{\% \text{OG}_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (10)$$

Em que:

OG_{inicial} = percentual inicial de Óleos e Graxas

OG_{final} = percentual final de Óleos e Graxas

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação dos lipídios microalgais extraídos da microalga *Spirulina platensis* e a caracterização de sua atividade emulsificante está apresentada na seção 3.1. O acompanhamento do processo de biorremediação, por meio da evolução de CO₂ e da determinação de óleos e graxas, encontra-se na seção 3.2.

3.1 Quantificação dos lipídios microalgais e atividades bioemulsificantes

O percentual de lipídios obtido a partir da biomassa seca foi de 8,78 % ± 0,04, os quais apresentaram atividades emulsificantes óleo em água (AE O/A) de 0,30 ± 0,02 UE/mg_{lipídio} e atividades emulsificantes água em óleo (AE A/O) de 11,83 ± 0,46 UE/mg_{lipídio}.

Na Figura 2 são apresentadas as determinações das atividades emulsificantes, sendo a parte superior representativa da emulsão A/O e a parte inferior representativa da emulsão O/A, verificando-se que os biossurfactantes microalgais apresentaram maior capacidade de formação de emulsões A/O do que O/A.

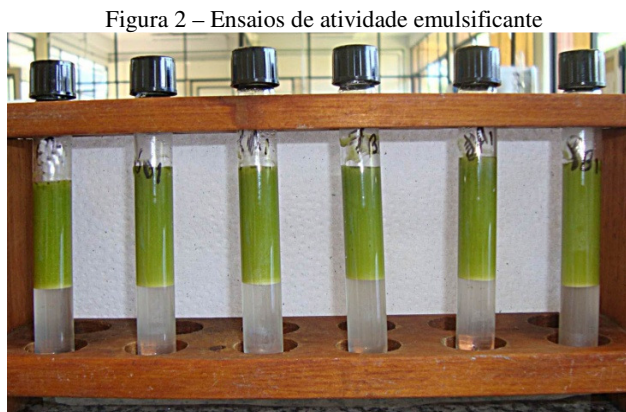


Figura 2 – Ensaios de atividade emulsificante

3.2 Evolução de CO₂ e biodegradação dos contaminantes

A respirometria é uma das técnicas que podem ser utilizadas para o acompanhamento das atividades realizadas pelos micro-organismos, e se baseia na análise do consumo de oxigênio ou produção de dióxido de carbono por unidade de volume e de tempo (BERNARDES; SOARES, 2005). Trata-se de uma metodologia adequada à quantificação da atividade biológica aeróbia, a qual determina a velocidade de respiração de uma biomassa ativa (PEDROTI, 2007). A respiração da comunidade do solo é utilizada como um indicador da atividade biológica (SOPPER, 1993).

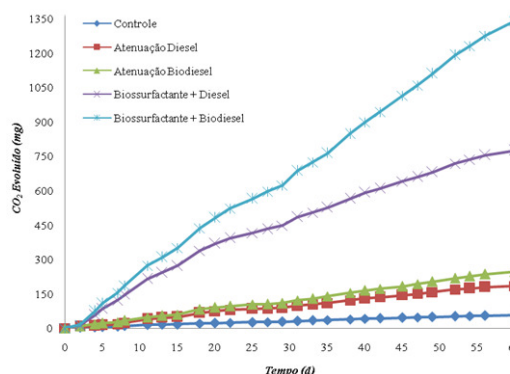
Na Figura 3 é apresentada a evolução de CO₂, durante os 60 dias de ensaio de biorremediação. Pode-se observar que os maiores valores de C-CO₂ acumulado (mg C) foram verificados nos ensaios adicionados do contaminante Biodiesel + Biossurfactante lipídico (Experimento 5), os quais acumularam 1.341,65 mg de CO₂, seguidos dos ensaios adicionados do contaminante Diesel + Biossurfactante lipídico (Experimento 4), com 775,3 mg C gerados. Os Experimentos 1 (Controle), 2 (Atenuação Diesel) e 3 (Atenuação Biodiesel) apresentaram valores acumulados de C (mg) bem inferiores, 56,69 mg, 184,51 mg e 246,80 mg de CO₂ acumulados, respectivamente, nos ensaios.

Observa-se que os ensaios adicionados do biodiesel apresentaram maiores valores acumulados de C-CO₂ evoluídos quando comparados aos ensaios adicionados de diesel.

Pedrotti (2007) avaliou durante 15 dias, diferentes cepas de micro-organismos, os quais mostraram diferentes potenciais de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, avaliadas em termos de produção de CO₂. As maiores produções de CO₂ observadas foram de 80,71 mg a 112,21 mg de CO₂, sendo inferiores as encontradas neste estudo, onde as maiores produções foram de 272,25 mg de CO₂ para solo contaminado com diesel e 349,98 mg de CO₂ para solo contaminado com biodiesel, ambos

bioestimulados com biossurfactante e em 15 dias de ensaio.

Figura 31 – Evolução de CO₂ ao longo dos 60 dias do ensaio



Na Tabela 3 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** estão apresentados os percentuais de biodegradação de óleos e graxas obtidos nos tempos de 30 e 60 dias e na Tabela 4 é apresentada a comparação de médias por meio do Teste de Tukey a 5% de significância para o percentual de biodegradação e evolução de CO₂ em função da técnica e do contaminante, para o tempo de 60 dias de biorremediação.

A adição do biossurfactante lipídico extraído das microalgas possibilitou elevados percentuais de biodegradação, como pode ser observado no Experimento 5 (biodiesel + biossurfactante), com biodegradação de 81,86% do contaminante. Os ensaios realizados com diesel + biossurfactante (Experimento 4) também apresentaram alto percentual de biodegradação, de 81,73 %.

O menor percentual de biodegradação foi observado no Experimento 3 (atenuação + biodiesel), no qual se obteve apenas 30,09 % de biodegradação.

Tabela 3 – Percentual de biodegradação ao longo dos 60 dias do ensaio

Ensaio	% de biodegradação	
	30 dias	60 dias
Atenuação-Diesel	56,37±6,22	54,36±9,32
Atenuação-Biodiesel	33,76±2,88	30,09±7,68
Diesel + Biossurfactante	68,34±7,82	81,73±5,16
Biodiesel + Biossurfactante	68,97±1,57	81,86±0,83

Tabela 4 – Teste de Tukey para comparação das médias das variáveis sobre % de biodegradação e evolução de CO₂

Técnica	Contaminante	Biodegradação (%)	Evolução CO ₂
Atenuação	Biodiesel	30,09 ^a	246,80 ^a
Atenuação	Diesel	54,36 ^a	184,51 ^a
Biossurfactante	Diesel	81,73 ^b	775,30 ^b
Biossurfactante	Biodiesel	81,86 ^b	1.341,64 ^c

Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa a 5% de significância.

A técnica de biorremediação utilizada foi significativa ($p < 0,05$) sobre o percentual de biodegradação e sobre a evolução de CO₂ (Tabela 4), independente do contaminante utilizado. O tipo de contaminante influenciou os resultados de evolução de CO₂, sendo a maior evolução

de CO₂ obtida no ensaio adicionado de biodiesel ($p < 0,05$) e biossurfactante. O ensaio adicionado de diesel e biossurfactante também apresentou resultados de evolução de CO₂ superiores aos obtidos na atenuação natural ($p < 0,05$). Esse comportamento é explicado via rotas metabólicas pelas quais esses contaminantes são degradados (DEON *et al.*, 2012). O biodiesel é um combustível derivado de óleos vegetais ou animais, normalmente composto de ésteres metílicos e ácidos graxos de cadeia longa e sua composição química é bastante variável (SCOTT *et al.*, 2010). No processo de biodegradação, os ácidos graxos são convertidos diretamente até acetilCOA pela beta-oxidação para posterior conversão a CO₂ por meio do ciclo de Krebs (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2006). Em comparação, os hidrocarbonetos de cadeia linear (alcanos, alcenos) primeiramente precisam ser convertidos a álcoois, aldeídos e posteriormente a ácidos graxos, para então serem convertidos pela beta-oxidação (FRITSCH; HOFRICHTER, 2005). Já compostos aromáticos como os HPA e BTEX, presentes no óleo diesel e óleo lubrificante, envolvem a conversão do substrato aromático em um metabólito como o catecol, com posterior abertura do anel por enzimas denominadas dioxigenases e conversão a compostos como acetil-CoA, oxalato e piruvato, os quais são intermediários do processo respiratório (LEMONS *et al.*, 2009).

Nos ensaios de atenuação natural, sem adição de biossurfactantes, verificou-se maior percentual de biodegradação nos experimentos adicionados de diesel, o que pode ser explicado pelo fato de existirem no solo micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo. Para a degradação do biodiesel pelos micro-organismos deste solo, o biossurfactante microalgal fez-se necessário, a fim de dispersar as moléculas do contaminante, tornando-as biodisponíveis para o processo de degradação, o que foi observado nos ensaios adicionados de biossurfactante, que independente do contaminante apresentaram percentuais de biodegradação semelhantes.

Chrzanowski *et al.* (2012) utilizaram bactérias produtoras de ramnolipídio para biodegradação de diesel e biodiesel B20 (20% de biodiesel e 80% diesel v/v). Os resultados obtidos confirmaram que o biodiesel é o combustível de preferência biodegradado em comparação com diesel, no entanto neste estudo obteve-se uma porcentagem de degradação semelhante para os dois contaminantes. Cyplik *et al.* (2011) obtiveram resultados semelhantes em que amostras de biodiesel sem biossurfactantes foram dissipada a uma velocidade maior em relação ao óleo diesel puro, enquanto a remoção de óleo diesel na mistura B20 ocorreu a um ritmo mais lento. Estudos realizados por Santos e Millioli (2003) verificaram a biodegradação de 19,8% de óleo cru em um solo bioestimulado com biossurfactante ramnolipídio, obtido de *Pseudomonas*. Millioli *et al.* (2007) utilizaram biossurfactante ramnolipídio (0,4 % e 0,6 %) para biodegradação de óleo cru e obtiveram 50 % de biodegradação do contaminante. Em ambos os trabalhos os

valores encontrados são inferiores ao verificados nesta pesquisa.

Lin *et al.* (2011) estudaram a biodegradação de óleo testando 5 tratamentos ao longo de 100 d: landfarming convencional, aprimoramento de nutrientes, adição de biossurfactante ramnolipídio, bioaumentação (consórcio microbiano de quatro cepas de bactérias degradadoras de petróleo), e combinação de bioaumentação e adição de biossurfactante. A melhor eficiência de degradação total foi obtida por bioaumentação + biossurfactante (90 %), seguida por bioaumentação (86 %), aprimoramento de nutrientes (84 %), adição de biossurfactante (78 %) e landfarming (68 %). Resultados semelhantes foram neste trabalho, com percentual de biodegradação de 80 %, com maiores percentuais de biodegradação nos primeiros 30 d. Este comportamento é explicado por Tauk (1990), uma vez que no solo ocorre uma rápida decomposição inicial da matéria lábil e, posteriormente, num processo mais lento, a decomposição de materiais resistentes. A fase lenta pode ocorrer devido ao mecanismo de adsorção, a estabilização dos metabólitos e a queda da taxa de biomassa no solo. Verificou-se neste trabalho que enquanto nos ensaios de atenuação a biodegradação ocorreu somente até os 30 d, nos ensaios com biossurfactante a biodegradação ocorreu mesmo que em taxas inferiores aos primeiros 30 d até os 60 d de ensaio. Isto demonstra a ação dos biossurfactantes nos processos de mobilização dos contaminantes da fração orgânica do solo.

kaczorek; Moszyn'ska; Olszanowski (2011) verificaram que a biodegradação dos hidrocarbonetos insolúveis em água pode ser significativamente aumentada pela adição de biossurfactante. Os resultados obtidos indicaram que, neste sistema de biodegradação, depois de 21 d, 92% do óleo diesel pode ser degradado usando surfactantes obtidos da *Pseudomonas alcaligenes*.

Em estudo sobre a eficiência e o padrão de degradação de petróleo de amostras de lodo e solo arenoso poluído de uma refinaria de óleo, foi utilizado um consórcio bacteriano de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* e *Micromonospora*, isolados a partir de uma amostra de lama de petróleo e caracterizados. Nitrogênio, fósforo e um surfactante químico foram adicionados para ambas as amostras e a bioaumentação foi usada na amostra de solo. Depois de 12 semanas, o grau obtido de degradação de TPH (total de hidrocarbonetos de petróleo) elevou-se a 82 % - 88 % em lama de petróleo e 86 % - 91 % no solo poluído (GOJGIC-CVIJOVIC *et al.* 2011).

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados os efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre a evolução de CO₂ e sobre o percentual de biodegradação, respectivamente. As variáveis (técnica de biorremediação e contaminante) foram significativas ($p < 0,001$) sobre a evolução de CO₂ (Tabela 5). Os efeitos estimados foram positivos (X_1 efeito = 842,81 e X_2 efeito = 314,31) e a interação entre as variáveis $X_1 - X_2$ também apresentou efeito positivo significativo (efeito = 252,02 e $p = 0,001$), demonstrando que tanto a técnica (adição de biossurfactante) como o contaminante (biodiesel) foram as melhores condições para os maiores valores acumulados de C (1.341,65 mg).

Na análise de variância do modelo de regressão gerado a partir da influência das variáveis sobre a evolução de CO₂, verificou-se valor de Fcalculado (26,07), superior ao Fcrítico (6,59) validando o modelo estatístico.

Tabela 5 – Efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre a Evolução de CO₂

	Coefficientes de Regressão	Efeitos estimados	p
Média	5.478.639	637,06	< 0,001
Técnica (X ₁)	- 50.319	842,81	< 0,001
Contaminante (X ₂)	- 54.880	314,31	< 0,001
Técnica-Contaminante (X ₁ - X ₂)	504	252,02	0,001

Em relação ao efeito das variáveis do delineamento experimental sobre o percentual de biodegradação verificou-se efeito positivo e significativo de X₁ (Técnica) (39,567 e p = 0,001). A variável X₂ e a interação entre as variáveis X₁ (Técnica) x X₂ (Contaminante) não apresentaram-se significativas ao nível de significância estudado.

Tabela 6 – Efeitos estimados e coeficientes de regressão gerados a partir das variáveis sobre o percentual de biodegradação de óleos e graxas

	Coefficientes de Regressão	Efeitos estimados	p
Média	268.086,9	62,013	0,000
Técnica (X ₁)	- 2.436,5	39,567	0,001
Contaminante (X ₂)	- 2.683,3	- 12,072	0,060
Técnica-Contaminante (X ₁ - X ₂)	24,4	12,197	0,058

A avaliação estatística apresentada corrobora os resultados previamente apresentados.

CONCLUSÃO

Os lipídios microalgais, extraídos da microalga *S. platensis* demonstraram-se eficientes e com grande potencial de aplicação em processos de biorremediação de resíduos oleosos.

A biorremediação de solo contaminado com diesel e biodiesel adicionada de biossurfactante microalgal demonstrou-se eficiente, apresentando resultados de biodegradação e evolução de CO₂ elevados. Obteve-se 81,7 % e 81,9 % de biodegradação para o diesel e biodiesel, respectivamente, em comparação com a atenuação natural, na qual obteve-se 54,4 % e 30,1 % para diesel e biodiesel. A evolução de CO₂ apresentou 1.341,65 mg e 775,3 mg de C (mg) acumulado para o biodiesel e diesel, respectivamente, nos ensaios adicionados do biossurfactante.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Rio Grande – FURG por ceder a biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457**: Amostras de solo: Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização. Rio de Janeiro, 1986.
- _____. **NBR 14283**: Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, 1999.
- ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: Wiley – Interscience, 2006, 609 p.
- AZEVEDO, A. C.; DALMOLIN, R. S. D. **Solos e ambiente: uma introdução**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2004.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051648>.
- BAPTISTA, P. M.; RIZZO, A. C. de L. **Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo**. In: XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2004.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER JR., W. T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160(3), p. 249-255, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.005>.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 6 ed. New York: W. H. Freeman, 2006.
- BERNARDES, R. S.; SOARES, S. R. A. **Fundamentos da Respirometria no controle de poluição da água e do solo**. Editora Universidade de Brasília: Finatec, Brasília, DF, 2005, 164 p.
- CHRZANOWSKI, L.; DZIADAS, M.; LAWNICZAK, L.; CYPLIK, P.; BIALAS, W.; SZULC, A.; LISIECKI, P.; JELEN, H. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 328-335, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.181>.
- CORSEUIL, H. X. **Influência do Receptor de Elétrons na Biorremediação de Águas Subterrâneas Contaminadas por Derramamentos de Gasolina**. VI Simpósio Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Florianópolis, v. I, p. 68-75, 1994.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface – active gents from two Bacillus species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- COSTA, M. R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro**. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos Universidade de Brasília, UnB, Brasília, 2009.
- CYPLIK, P.; SCHMIDT, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; LISIECKI, P.; HEIPIEPER, H. J.; OWSIANIAK, M.; VAINSHTEIN, M.; CHRZANOWSKI, L. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4347-4352, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.068>.
- DEON, M. C.; DE ROSSI, A.; DAL MAGRO, C.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, jan./jun.2012. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2012v33n1p73>.

- DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos gaxos poliinsaturados.** Tese (Doutorado) em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2006.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, 47-64, 1997.
- FOLCH, J.; LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic degradation by microorganisms. In: JÖRDENING, H. J.; WINTER, J. **Biotechnology: environmental processes II**. Second Edition. Volume 11b, Published online, 2005.
- GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; MILIC, J. S.; SOLEVIC, T. M.; BESKOSKI, V. P.; ILIC, M. V.; DJOKIC, L. S.; NARANCIC, T. M.; VRVIC, M. M. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. **Biodegradation**, v. 23, p. 1-14, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-011-9481-1>.
- KACZOREK, E.; MOSZYN'SKA, S.; OLSZANOWSKI, A. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. **Biodegradation**, v. 22, p.359-366, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-010-9406-4>.
- LEMOES, J. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; BARROS, C. A.; SCHLITTLER, L. A. F. S. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), propriedades e fatores que afetam sua degradação. **Diálogos e Ciência**, Salvador, ano 3, n. 11, 79-87, 2009.
- LIN; TA-CHEN; PAN, PO-TSEN; YOUNG, CHIU-CHUNG; CHANG, JO-SHU; CHANG, TSUNG-CHUNG; CHENG, SHENG-SHUNG. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science Pollution Research**, v. 18, p. 1487-1496, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0485-5>.
- MATHEW, M.; TAN, L. R.; SU, Q.; YANG, X.; BAXTER, M.; SENIOR, E. Bioremediation of 6% [w/w] diesel-contaminated Mainland soil in Singapore; comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Engineering Life Science**, v. 6, n. 1, p. 63-67, 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200620119>.
- MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação.** Tese (Doutorado) em Ciência dos Alimentos, Universidade de Campinas, UNICAMP, 2004.
- MENEGHETTI, L. R. R. **Bioremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado Com óleo diesel e biodiesel.** Dissertação (Mestrado) em Engenharia, área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente. Universidade de Passo Fundo, UPF, 2007.
- MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre, Gênese, 2000.
- MILLIOLI, V. S.; SÉRVULO, E. F. C.; SOBRAL, L. G. S.; de CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de ramnolípido quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. **CT2007-031-00**, Comunicação Técnica, 4º. **Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás.** Campinas, 2007.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras: Ed. UFLA, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.; Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, 772-776, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>.
- PACWA-PLOCINACZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications os Biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 6332-654, 2011.
- PEDROTI, G. I. **Ensaio de Biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos.** Dissertação (Mestrado) em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Vitória, 2007.
- PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology.** Boston: McGraw-Hill, 1999.
- PRIETTO, P. D.; REGINATTO, C.; KORF, E. P.; THOMÉ, A.; CANSOLI, N.C. Comportamento hidráulico e reativo de uma mistura solo-cimento para barreiras de fundo em aterros de resíduos sólidos, in: **Congresso Brasileiro de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica**, 15 ed., ABMS, Gramado, RS, Brasil. "CD-ROM", 2010.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6).
- SANTOS, L. C.; MILLIOLI, V. S. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. Anais XI Jornada de Iniciação Científica, 2003.
- SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; LEA-SMITH, D. J. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 277-286, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>.
- SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 269-283, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00099-3).
- SOOPPER, W. E. **Municipal Sludge use in Land Reclamation.** Boca Raton, CRC Press. 163, 1993.
- STRECK, E. V. **Solos do Rio Grande do Sul.** 2. ed. Porto Alegre: EMATER, RS, Brasil, 2008.
- TAUK, S. M. Biodegradacao de residuos organicos no solo. Revista Brasileira de Geociência, v. 20, p. 299-301, 1990.
- TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.057>.
- TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.** Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.
- USEPA, U. S. Environmental protection agency, 1996. **Method 3050B.** Disponível em: <<http://pbadupws.nrc.gov/docs/ML1105/ML110590640.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2015.