

BIODEGRADAÇÃO DE BIODIESEL POR CONSÓRCIO DE MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETO

M. F. A. da ROCHA¹, O. M. MARQUES¹ e S. M. SARMENTO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: smsarmento@gmail.com

RESUMO – O processo de biodegradação de um composto orgânico (biocombustíveis) permite a atuação de micro-organismos na recuperação de áreas contaminadas por este, e que pode ser acompanhado pela evolução dinâmica do CO₂, entre outros métodos. Neste trabalho, foi avaliada a degradação em meio aquoso do biodiesel de algodão (B100-A) através da concentração de biomassa microbiana, teor de éster metílico de ácidos graxos (EMAG), pH, DQO e DBO₅. Usou-se o consórcio de micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* não aclimatados e pré-selecionados pela técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol dihidratado (DCPIP). Resultados deste estudo mostraram que: a) O B100-A apresentava em sua composição 27,2 % de EMAG saturados (C16:0 e C18:0) e 72,8 % insaturados (C18:1 e C18:2); b) O pH inicial (6,0) mostrou maior redução (3,1) ao 35^a dia de processo resultando a redução de células viáveis (10⁶ a 10⁴ UFC.cm⁻³) entre 14 a 35 dias; c) O EMAG C18:2 decompôs-se em C16:0 e C18:0. Do 7^a ao 35^a dia transformaram-se entre si os EMAG C16:0, C18:0 e C18:1. Os produtos da degradação destes mostraram que a DBO₅ aumentou (522,7 %) do 0 a 14^a dia e (6,6 %) do 14^a ao 28^a dia que indicou redução da biodegradabilidade do B100-A pela redução da oxidação destes verificada pela DQO. Conclui-se que o B100-A sofreu degradação primária em presença do consórcio microbiano associada a concentração de biomassa relacionada à variação de pH da fase aquosa sem controle do pH.

1. INTRODUÇÃO

O Biodiesel (B100) é um combustível alternativo, produzido a partir de recursos renováveis provenientes da biomassa, o que diminui a dependência do petróleo e como tal, tem recebido intensa atenção devido o rápido crescimento do preço deste insumo e a preocupação com o meio ambiente. O B100 apresenta alto potencial de biodegradabilidade, pois é composto por ésteres alquílicos de ácidos orgânicos, EAAG (Ferrari *et al.*, 2005). É totalmente solúvel no diesel (B0) cujas misturas têm sido formuladas (Misturas B0/B100) com proporção de B100 que podem variar de 1 a 99 % (v/v). Especificamente no Brasil, o B100 tem sido utilizado como aditivo ao B0 com percentual de 5 % (v/v) desde 2010 (Kardec, 2011). Dados estatísticos mostram que, no Brasil, atividades como carga e descarga de petróleo e derivados, operações de lavagem de tanques de navios, tratamentos de óleo entre outras, contribuem com 90 % da poluição por hidrocarbonetos de petróleo. Acidentes com transporte contribuem com apenas 5

a 10 % da poluição, porém, sua ocorrência é muito mais danosa ao meio ambiente, caso não seja controlada rapidamente (Vital, 1992 ; Ururahy, 1998). Portanto, com a comercialização do B0, contendo B100 como aditivo, há necessidade de se estudar o possível impacto deste no meio ambiente aquático (Rodrigues, 2009).

Poucos estudos têm sido realizados sobre a biodegradação do B100 em ambiente aquático e como este impactaria a degradação do B0 nesse ambiente. De acordo com (Zhang *et al.*, 1998), o B100 pode promover e acelerar a biodegradação aeróbia do B0 em misturas aquosas contendo nutrientes e biomassa por meio do processo biológico conhecido como cometabolismo. Geralmente, na biodegradação de compostos orgânicos, a atividade microbiana é o mecanismo predominante (Kemp, 2003) como alternativa viável na descontaminação de locais impactados que consiste na utilização de um ou mais consórcios microbianos, indígenas ou não, para a degradação de contaminantes orgânicos (Pereira e Lemos, 2006) e a obtenção de energia podendo ser averiguada preliminarmente usando indicadores desta, tais como, a produção de dióxido de carbono, consumo de oxigênio, evolução dinâmica do pH, DQO e DBO₅ no meio (Zhang *et al.*, 1998). Os micro-organismos quebram as moléculas do composto orgânico poluente em outras com estruturas moleculares mais simples (processo de biodegradação), que podem seguir quebrando-se em outras mais simples até atingirem, por fim, o nível químico (mineralização biótica).

Rocha *et al.* (2011) estudaram a biodegradação do B100-A em sistema aeróbio em presença do consórcio constituído por culturas puras (*P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*) pré-selecionados pela técnica do indicador redox DCPIP e não-aclimatadas cujo desenvolvimento foi acompanhado através de monitoramento, por período total de 35 dias, dos seguintes parâmetros de processo: concentração dos EMAG, pH, DBO₅ e DQO.

Verificou-se que o B100-A sofreu degradação primária cujo EMAG C18:2 se decompôs totalmente nos 7 primeiros dias do processo, no entanto os C16:0, C18:0 e C18:1 decompuseram em determinados períodos do processo, em outros, porém, são produtos da decomposição de alguns desses EMAG cuja produção ocorreu com intensidade máxima nos 7 primeiros dias do processo. Esses EMAG passaram a decomporem-se no intervalo de tempo de 7 a 21 dias de processo, em seguida, oscilaram entre produto e reagente indicando que transformaram se entre si. O processo de degradação do B100-A foi acompanhado através do pH como sensor de ocorrência de biodegradação do sistema, cuja população de biomassa apresentou fase de adaptação (0 a 7 dias), crescimento (14 a 21 dias) e morte celular (7 a 14, 21 a 35 dias). Os produtos da degradação dos EMAG ao longo do processo mostraram ser menos biodegradáveis que seus precursores, gerando maior demanda de oxigênio dissolvido da fase aquosa do B100-A para sua biodegradação aeróbia verificado pela avaliação da DBO₅ e DQO principalmente após o 7º dia de processo. O objetivo deste trabalho foi verificar a biodegradação do B100-A da fase líquida através da concentração de biomassa microbiana, teor de éster metílico de ácidos graxos (EMAG), pH, DQO e DBO₅ quando no processo houver ausência do controle de pH.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Biodiesel de algodão: O B100-A não aditivado foi cedido pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste- CETENE, cujas propriedades físico-químicas são mostradas na Tabela 1. Este combustível em estudo foi esterilizado por meio de filtração a vácuo em membrana Millipore (Marca Gelman Sciences 0,22 μm) e acondicionado em frasco âmbar estéril.

Tabela 1– Propriedades físico-químicas do biodiesel de algodão (Fonte: CETENE)

Combustível	ET* (mg.Kg ⁻¹)	ρ 20°C (Kg.m ⁻³)	μ 40°C (cSt)	PF** (°C)
B100-A	0	883,1	4,8	152

*ET (Enxofre Total), **PF (Ponto de Fulgor), ρ (massa específica), μ (viscosidade absoluta).

Micro-organismos: As culturas microbianas puras que constituíram o consórcio microbiano foram a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853- DAUFPE 416) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 5107- DEQUFPE) cujos meios de cultivo foram Agar Mueller-Hinton (HIMEDIA) e Agar de Sabouraud (Merck), respectivamente. Estas culturas foram mantidas acondicionadas sob refrigeração (5° C) e repicadas a cada dois meses. Usou-se no preparo do inoculo o meio de cultura mínimo (MCM): 0,5 % NaCl ; 0,1 % K₂HPO₄ ; 0,1 % KH₂PO₄ ; 0,1 % (NH₄)₂SO₄ ; 0,02 % MgSO₄.7H₂O ; 0,3 % KNO₃ ; acrescido de glicose.

2.2 Métodos

Meio de crescimento e inoculo: Inoculos individuais (10 cm³) das espécies microbianas que constituíram o consórcio microbiano em estudo foram preparados usando-se o MCM, sendo mantidos a 30 °C por 72 h. Frascos Erlenmeyer (1000 cm³) contendo 25 cm³ dessas culturas (concentração em UFC padronizada em 10⁸ UFC.cm⁻³ na proporção de bactéria: levedura: 1:1) em 100 cm³ de MCM mantidos sob agitação orbital (120 rpm), a 30 °C por 72 h de cultivo em Câmara incubadora (Marca Marconi, modelo MA-420).

Sistema experimental: O ensaio biótico, em duplicata, foi conduzido em microcosmos formado por frascos Erlenmeyer (2000 cm³), contendo meio MCM sem glicose (700 cm³), suspensão do inoculo (250 cm³) e B100-A (50 cm³) submetidos à agitação orbital (120 rpm) a 30 °C em câmara incubadora (Marca Marconi, modelo MA-420) por período total de 35 dias.

Ensaio de biodegradação e determinações analíticas: Realizaram-se amostragens a cada 7 dias, incluindo-se o dia 0 de processo monitorado através do acompanhamento das evoluções da

concentração de células viáveis (X), concentração de EMAG, DBO₅, DQO e pH da fase líquida. 1 cm³ da amostra foi utilizado para avaliar-se a concentração de células viáveis (X), pelo método de contagem em placas (*pour plate*) usando-se o meio de cultura “Plate Count Agar” (PCA) (Merck). O restante do volume da amostra foi submetido à filtração a vácuo em membrana Millipore (Marca Gelman Sciences 0,22 μm) para separar a biomassa microbiana do líquido metabólico cujo sobrenadante foi usado nas determinações do pH (sensor de pH de bancada, Marca MARCONI, modelo PA 200/PA 200P), DBO₅ (Incubadora DBO, Marca Quimis) e DQO (digestor de DQO, Marca Merck, modelo Q- 315M26), utilizando-se o *Standard Methods* 5210B e 5220C, respectivamente. A concentração dos EMAG dissolvidos na fase aquosa foi obtida, usando-se parte da solução aquosa (fase polar) extraída com hexano, por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Marca CG, modelo Master). Utilizou-se coluna cromatográfica capilar Marca Carbowax (dimensão: 30 m de comprimento, 5,3 x 10⁻⁴ m de diâmetro interno e espessura da fase estacionária de 1 x 10⁻⁹ m), respectivamente e detector DIC e gás de arraste, hidrogênio com 99 % de pureza (White Martins) com vazão de 8,3 x 10⁻⁸ m³/s . Os resultados obtidos apresentaram erros experimentais máximos de 1 % .

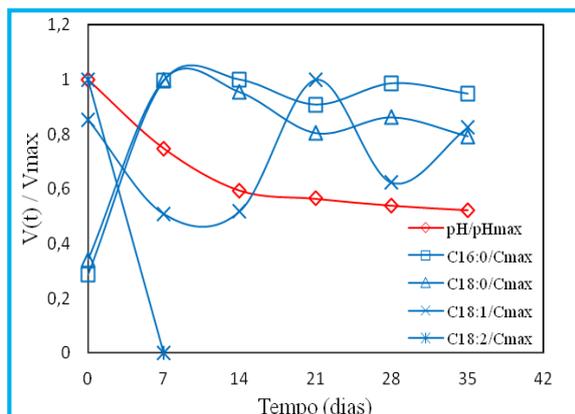
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 consta a composição do B100-A que apresenta uma mistura de EMAG saturados (27,2 %) e insaturados (72,8 %).

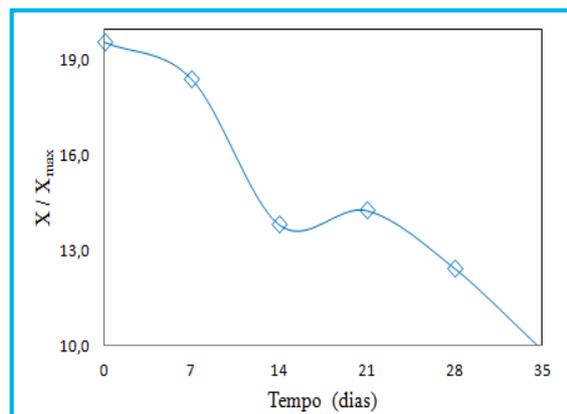
Tabela 2– Perfil de EMAG do B100-A

EMAG	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Ésteres totais
Teor (%)	0,8	23,5	3	15,6	56,6	0,6	100,1

As Figuras 1a e 1b apresentam concentração normalizada dos EMAG, pH e biomassa microbiana, respectivamente. Figuras 2a e 2b mostram resultados da DBO₅ e DQO ao longo do tempo de processo, respectivamente.

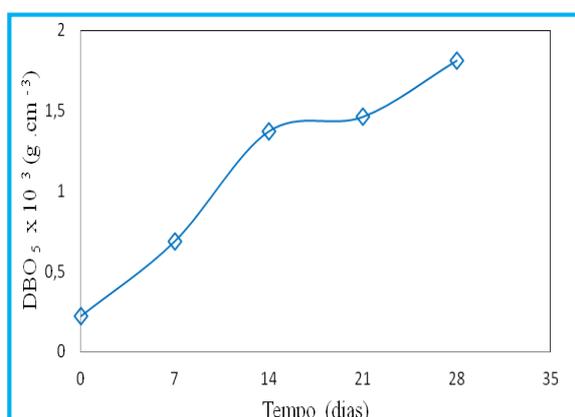


(a)

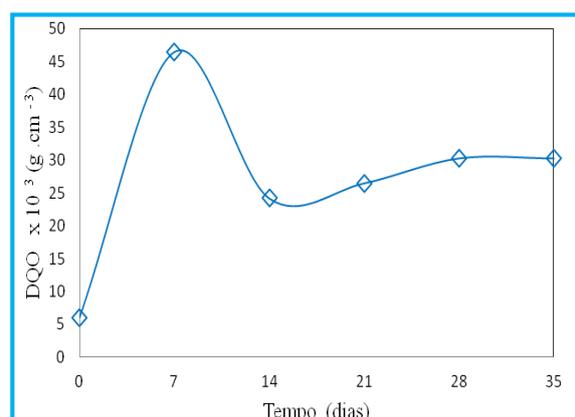


(b)

Figura 1– Evolução dinâmica de parâmetros de processo normalizados: (a) concentração de EMAG e pH; (b) concentração de biomassa microbiana. [$V(t)$: variável, $V_{máx}$: valor máximo da variável].



(a)



(b)

Figura 2– Evolução dinâmica de parâmetros do processo normalizados: (a) DBO₅; (b) DQO.

Nas Figuras 1 e 2 pode-se verificar a variação da concentração normalizada da mistura reagente, da concentração de biomassa, DBO₅ e DQO comparada com a variação do pH durante os cinco períodos (0 a 35 dias) do processo de degradação do B100-A em meio aquoso sob a ação do consórcio (*P.aeruginosa* e *S. cerevisiae*). Resultados mostraram que : a) **Período 1** (0 a 7 dias) - o EMAG C18:1 decompôs-se parcialmente no EMAG C16:0, na proporção de 7,7 % de seu teor de massa original (15,6 %). O C18:2 foi totalmente decomposto em ésteres mais estáveis, sendo eles os C16:0 e C18:0, nas proporções de 62,0 % e 38,0 % , respectivamente de seu teor em massa original (56,7 %). Observou-se aumento da DQO até o 7º dia e pico máximo no 7º dia do processo indicando neste período elevada carga orgânica enquanto que a DBO₅ apresentou discreto aumento gerando demanda de oxigênio dissolvido para o processo de

degradação. O pH inicial (6,0) foi reduzido a 4,49 indicando a decomposição do B100 devido à formação de ácidos graxos livres de EMAG de cadeias menores que seus precursores no entanto, a população de células viáveis apresentou fase de adaptação ao meio (ordem de grandeza de 10^8 UFC.cm⁻³).

b) **Período 2** (7 a 14 dias) - perfis obtidos para os C16:0, C18:0 e C18:1 indicaram que o C18:0 (8,30 %) decompôs-se parcialmente no C16:0 e C18:1, no entanto, concentrações do C16:0 (82,20 %) e C18:1 (9,50 %) aumentaram tornando-se produtos desta decomposição. A biodegradação da matéria orgânica apresentou aumento mais intenso até o 14º dia (522,7 %) de processo gerando maior demanda de oxigênio dissolvido para sua biodegradação aeróbia, no entanto, a DQO apresentou redução da carga orgânica. Houve aumento elevado da acidez do meio aquoso (6,00 a 3,57) que corresponde a 49,00 % resultando na redução de células viáveis (ordem de grandeza de 10^8 UFC.cm⁻³ a 10^6 UFC.cm⁻³) responsáveis pela degradação dos contaminantes (Corseuil *et al.*, 2003).

c) **Período 3** (14 a 21 dias) - os C16:0, C18:0, C18:1 continuam fazendo parte significativa da composição da mistura reagente no entanto, mantém oscilação em sua composição cujos EMAG C16:0 (74,70 %) e C18:0 (7,00 %) decompuseram-se parcialmente no C18:1, tornando-o produto neste período do sistema. A variação do pH foi pequena (3,57 a 3,39) do 14º a 21º dia de processo. Os produtos da degradação neste período mostraram ser menos biodegradáveis que seus precursores cuja DBO₅ mostrou aumento de (106,6 %) gerando menor demanda de oxigênio dissolvido da fase aquosa do B100-A comparada ao período anterior enquanto que, a DQO apresentou discreto aumento (57 %).

d) **Período 4** (21 a 28 dias) - o EMAG C18:1 se decompôs parcialmente nos ésteres C16:0 e C18:0, considerando-se estes como produtos da decomposição destes EMAG cuja biodegradação da matéria orgânica e DQO apresentaram aumento discreto da carga orgânica devido seus produtos serem menos biodegradáveis que seus precursores quando comparado ao período 3 (124 % e 114,3 %), respectivamente. O pH de 3,39 passou a 3,24 reduzindo a ordem de grandeza de 10^6 a 10^5 UFC.cm⁻³.

e) **Período 5** (28 a 35 dias) - a concentração dos EMAG C16:0 (78,00 %), C18:0 (6,90 %) e C18:1 (15,10 %) continuaram a variar, entre si, havendo uma espécie de oscilação na composição desses, que ora decompõem-se, ora são produtos passando o C16:0 e o C18:0 a decompor-se no EMAG C18:1. O pH ao final dos 35 dias apresentou valor de 3,14. A decomposição dos C18:2 e C18:1 no período 1 (0 a 7 dias) deve-se ao fato destes apresentarem ligações insaturadas em sua molécula uma vez que, a biodegradabilidade de compostos orgânicos é indiretamente proporcional ao número de átomos de carbono e de ramificações presentes neste (Morrison e Boyd, 1992). Portanto, o B100-A apresenta alta susceptibilidade à biodegradação primária, pois apresenta 72,8 % de EMAG insaturados, dos quais, 56,6 % são de C18:2 enquanto que, os C16:0 e C18:0, principais produtos formados, ao final do 7º dia de processo apresentaram comportamento praticamente similar e maior teor em massa (82,00 %) e (8,70 %) de seu teor de massa original (23,5 %) e (2,97 %), respectivamente. Devido à

dificuldade de clivagem de suas ligações relacionada ao grau de insaturação que a compõem (Ferrari *et al.*, 2005). O EMAG C18:1 que se decompôs nos 7 primeiros dias do processo, passa a ser produto da decomposição dos EMAG (7 a 14 dias), apresentando a concentração em seu máximo (18,30 %) iniciando um processo de oscilação entre ser produto de decomposição e reagente também verificado aos C16:0 e C18:0 indicando transformação entre si, como se houvesse uma ação sinérgica sobre esses até o 35° dia. O B100-A respondeu a ação microbiana do consórcio cuja concentração de células viáveis foi inicialmente padronizada, indicou que é biodegradável devido à redução do pH e aumento elevado de acidez do meio líquido mostrado pelo pH: 3,57 ao 14° dia atingindo ao final dos 35 dias de processo 3,14.

4. CONCLUSÕES

O B100-A sofreu biodegradação primária em presença do consórcio microbiano (*P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*) verificada durante o período total de 35 dias de processo. No processo de biodegradação houve modificação significativa na composição inicial dos EMAG do B100-A com formação de ácidos graxos livres de EMAG de cadeias menores que seus precursores e menos biodegradáveis devido sua instabilidade molecular relacionada a concentração de biomassa e à variação de pH da fase aquosa sem controle do pH.

5. REFERENCIAS

- CORSEUIL, H. X.; KULKAMP, M. S. *Simultaneous Spills of diesel and ethanol – a controlled release experiment*. IN: 7 TH INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, Orlando, FL. Columbus-Richland: Battele Press, p. 1-5, 2003.
- FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. *Biodiesel de soja- taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia*. *Quím. Nova*, p. 19-23, 2005.
- KARDEC, A. *ANP discutirá adição de mais biodiesel ao diesel convencional*. Disponível em: <<http://tnsustentavel.com.br/.../ANP>>. Acesso em: mar. 2011.
- KEMP, D. *National standard for biodiesel*. Setting National Fuel Quality Standards, n.6, p.1-103, 2003.
- MORRISON, R.; BOYD, R. *Química Orgânica*. Trad. de M.A. da Silva e A.J. de Gouveia. Lisboa: Fundação C. Gulbenkian, 1992.
- PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. *Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por Aspergillus niger e Penicillium corylophilum*. Disponível em: <<http://scielo.com.br>>. Acesso em: mar. 2006.

- ROCHA, M.F.A.; MARQUES, O.M. ; SARMENTO, S.M. *Biodegradação Primária do Biodiesel de Algodão e da sua Mistura B5 em Meio Aquoso por Consórcio Microbiano*. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Caxias do Sul/Rio Grande do Sul, 2011.
- RODRIGUES, R. *B5 começa a valer em 1º de janeiro de 2010*. Disponível em:< <http://biodieselbr.com/noticias>>. Acesso em: outubro 2009.
- URURAHY, A.F.P. *Biorremediação de Resíduo Oleoso proveniente de Refinaria*. Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1998.
- VITAL,N. *Formação de emulsificantes por Candida guilliermondii T9 a partir de querosene*. Dissertação de Mestrado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1992.
- ZHANG,X.;PETERSON, C.L.;REECE, D.;MOLLER, G.; HAWS, R. *Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment*. *Trans. ASAE*, p. 1423-1430,1998.