

Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo

Use of biosurfactants produced from waste oil agribusiness in the bioremediation

R. K. S. Morais & A. K. S. Abud

Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió-Al, Brasil

renara_kariny@hotmail.com

(Recebido em 25 de julho de 2012; aceito em 30 de outubro de 2012)

Os processos de biorremediação fazem uso de microrganismos para minimizar poluentes de hidrocarbonetos de petróleo, tornando-se uma alternativa estratégica às convencionais tecnologias para remediação de áreas contaminadas, com menor custo operacional e mínimos efeitos adversos ao ambiente. Este trabalho avalia o potencial de biorremediação por biossurfactantes produzidos em meio mineral suplementado com fontes alternativas de carbono, como vinhaça, manipueira e óleo residual de fritura. Quatorze microrganismos, selecionados pelo teste de biodegradabilidade em petróleo, na presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), foram avaliados quanto à capacidade de remoção de solos contaminados com petróleo. Os resultados obtidos mostraram que os biossurfactantes em meio mineral suplementado com óleo e manipueira, em concentrações de 1,5%, conseguiram remediar o óleo da areia de praia contaminada pelo petróleo em cerca 83%, para o microrganismo isolado do solo. Esse percentual foi superior aos biossurfactantes comerciais ou sintéticos existentes e disponíveis no mercado.

Palavras-chave: Biossurfactantes; Resíduos agroindustriais; Biorremediação

Bioremediation processes make use of micro-organisms to minimize pollutants from oil hydrocarbons, making it a strategic alternative to conventional technologies for contaminated areas remediation, with minimum operational cost and adverse effects to the environment. This study evaluates the potential for bioremediation by biosurfactants produced in mineral medium supplemented with alternative carbon sources such as vinasse, cassava wastewater (manipueira) and residual oil for frying. Fourteen micro-organisms, selected for testing the biodegradability of oil, in the presence of the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP), were evaluated for the capacity of remove oil contaminated soils. The results showed that the biosurfactants in medium supplemented with mineral oil and manipueira at concentrations 1.5% were able to overcome the oil of beach sand polluted by oil in about 83% to the micro-organism isolated from soil. This percentage was higher than the commercial biosurfactants or synthetic existing and available on the market.

Keywords: Biosurfactants; Agroindustrial wastes; Bioremediation

1. INTRODUÇÃO

A contaminação causada pela exploração do petróleo e seus derivados causam grande impacto ambiental e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas, pois essas substâncias apresentam propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos [1,2].

Grande parte das reservas de petróleo encontra-se no mar e os processos de transporte, estocagem e refino são os responsáveis pela introdução de quantidades consideráveis desse composto no ambiente. Os derramamentos acidentais de petróleo causam, geralmente, grandes impactos ambientais, o que exige a remoção imediata do contaminante. Atualmente, diversas estratégias para remediação de áreas afetadas por petróleo estão disponíveis. Todavia, as técnicas convencionais apresentam problemas operacionais em razão do seu alto custo, necessidade de pessoal e de equipamentos especializados. Biorremediação é uma tecnologia que utiliza microrganismos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente ou a sua redução a níveis de concentração aceitáveis [3]. Diante disso, os processos de biorremediação tornam-se uma alternativa às tecnologias convencionais para remediação de

áreas contaminadas com petróleo e seus derivados, com um menor custo operacional e mínimos efeitos adversos ao ambiente [4, 5, 6].

Surfactantes são moléculas com propriedades tensoativas que possuem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, os quais determinam propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, lubrificação, ação espumante ou antiespumante, capacidade molhante, solubilização e detergência, imprescindíveis nos processos de biorremediação, podendo ser produzidas por síntese química (surfactantes sintéticos) ou biológica (biossurfactantes) [7].

A aplicação dos biossurfactantes está diretamente relacionada às propriedades físico-químicas de cada composto [8]. Entre as vantagens sobre os surfactantes químicos, destacam-se a biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução da tensão superficial, estabilidade térmica e produção a partir de substratos renováveis. Apesar disto, o alto custo para sua obtenção impede sua viabilidade de aplicação [9]. O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes [4,10]. Outras aplicações incluem os processos de biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, a remoção e mobilização de resíduos de óleo de tanques de armazenamento e a recuperação melhorada de petróleo.

Muitas espécies de bactérias liberam biossurfactantes na presença de hidrocarbonetos hidrofóbicos, promovendo o aumento da solubilidade desses compostos no meio [10,11]. Estudos também citam a capacidade de crescimento do fungo *Cladosporium resinae* [12], frequentemente isolado de tanques combustíveis, ao utilizar misturas de alcanos, produzindo ácidos graxos e fosfolipídios extracelulares, principalmente o ácido dodecanóico e a fosfatidilcolina, aumentando a taxa de degradação do alcano em até 30% [13].

Os microrganismos produtores de surfactantes também podem ser usados para aumentar a solubilização de outros grupos de compostos orgânicos tóxicos, como os defensivos agrícolas [14]. A degradação de hexaclorociclohexano por *Pseudomonas aeruginosa* foi relatada, sendo que outros organoclorados como DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau [13]. O surfactante de *P. aeruginosa* UG2 aumentou a solubilização de hexaclorobifenila aderida ao solo e resultou na recuperação de até 31% do composto na fase aquosa [13], três vezes superior à obtida com o surfactante químico, lignossulfonato de sódio. Os biossurfactantes têm recebido crescente atenção nos últimos anos por sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e diversidade de aplicações e funcionalidade sob condições extremas.

Como estratégia para a redução dos altos custos da produção industrial de biossurfactante, os subprodutos da agroindústria vêm sendo avaliados como fonte de carbono alternativa, favorecendo, também, a minimização do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses rejeitos no ambiente [8, 15,16].

Este trabalho avalia o potencial de biorremediação microbiana facilitada pela produção de biossurfactantes produzidos em meio mineral suplementado com fontes alternativas de carbono, como vinhaça, manipueira e óleo residual de fritura a partir de microrganismos isolados do solo contaminado por estes resíduos e selecionados pelo teste de biodegradabilidade em petróleo, na presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). A importância deste estudo visa externar a preocupação ambiental em reaproveitar resíduos agroindustriais e inserir o fator social como fruto de avanços tecnológicos, aliado à interdisciplinaridade, permitindo a viabilidade do desenvolvimento sustentável.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os resíduos agroindustriais, manipueira (M) e vinhaça (V) e óleo de frituras (O), foram adquiridos em indústrias de Alagoas. A manipueira foi adquirida em casa de farinha no município de Junqueiro. A vinhaça foi gentilmente cedida pela usina Cachoeira, localizada em Maceió. O óleo vegetal residual foi obtido de um restaurante dentro da Universidade Federal de Alagoas. Utilizou-se solo comum, coletado nas proximidades do laboratório, para a contaminação das amostras.

Foram utilizados onze isolados microbianos produtores de biossurfactantes (2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 25, 33, 35 e 43) [17], 3 microrganismos isolados em pesquisas anteriores pelo Laboratório de Ensino em Engenharia Química (C2, C9 e C10) e a levedura *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), gentilmente cedida pelo BIOSE da Escola de Química da UFRJ.

Os onze microrganismos isolados foram previamente identificados através do teste de biodegradabilidade, no qual se verifica o potencial microbiano de produzir biossurfactantes, realizando-se uma triagem inicial por meio da técnica de biorremediação do petróleo, baseada no uso do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) [18]. Neste teste, durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato. Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível averiguar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato a partir da observação de mudança de coloração do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Todos os onze microrganismos foram capazes de oxidar o DCPIP em concentrações de até 1% de petróleo.

A capacidade de remoção de solos contaminados com óleo foi feita de acordo com metodologia descrita na literatura [19]. A adequação do biossurfactantes para a recuperação de óleo como o petróleo foi realizada utilizando 180 g de areia da praia impregnadas com 15 mL do óleo. Frações de 10 g da areia contaminada foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, nos quais 30 mL de água destilada foram adicionados como controle negativo, 30 mL do surfactante sintético SLS[®] (lauril sulfato de sódio) foram adicionados como controle positivo e 30 mL de solução aquosa de biossurfactante a uma concentração de 1,5 %.

No tratamento, as amostras foram incubadas em um agitador orbital (*shaker*) a 110 rpm por 24 horas a 24°C e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos para a separação da solução de lavagem e da areia.

A quantidade de óleo residual que permaneceu na areia após a utilização do biossurfactante foi determinada, por gravimetria, como a quantidade de material extraído da areia com hexano [15].

A Figura 1 esquematiza o processo de contaminação da areia de praia com o óleo cru até remoção do petróleo pelas 14 amostras de sobrenadantes, livres de células microbianas, que apresentaram em estudos anteriores capacidade de facilitar o contato com os microrganismos no processo de biorremediação. As amostras das sete diferentes composições do meio mineral foram utilizadas na concentração 1,5% (v/v). A areia da praia (a) foi contaminada pelo óleo (b) e distribuída em Erlenmeyers (c), que receberam as amostras de biossurfactante, mantendo um contato de 24h em *shaker* a 24°C e 110rpm (d). Após esse período, obtiveram-se os óleos recuperados pela biorremediação (e).



Figura 1: Etapas do processo de biorremediação com areia de praia contaminada com petróleo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vantagem de se ter neste estudo várias amostras microbianas, por mais que não se tenha a identificação completa das espécies, é vantajoso, pois permite uma varredura nas características que mais se enquadram na técnica de biorremediação. A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes [16, 20, 21]. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de

consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo.

Os resultados do potencial para avaliar a capacidade das 14 amostras de biossurfactantes na biorremediação do petróleo cedido pela PETROBRÁS, nos sete meios: glicose (G), vinhaça (V), manipueira (M), óleo + glicose (OG), óleo + vinhaça (OV), óleo + manipueira (OM) e vinhaça + manipueira (VM), além de água, do surfactante sintético SLS® e da levedura *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) são mostrados nas Figuras 2 a 4.

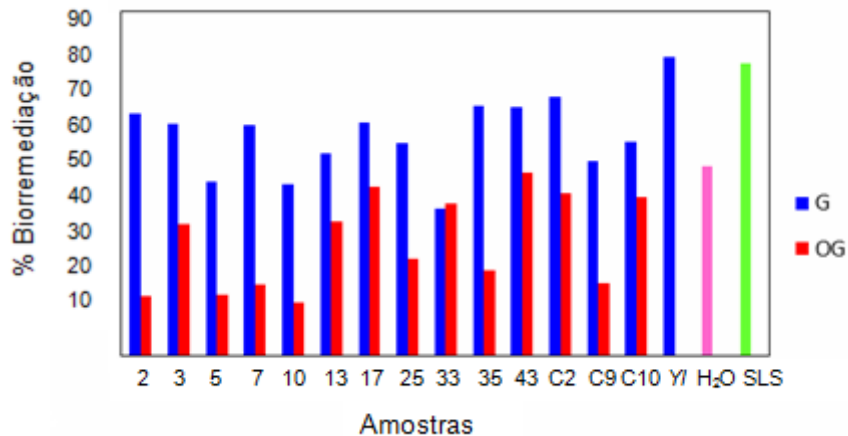


Figura 2: Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes, *Yarrowia lipolytica* e SLS® na concentração de 1,5% (v/v) em meios de glicose (G) e óleo + glicose (OG).

Nos ensaios formulados com 2% de glicose (Figura 2), observou-se que alguns isolados microbianos (2, 3, 7, 17, 35, 43 e C2) tinham capacidade acima de 60% em reduzir a contaminação pelo petróleo. Porém, na presença de glicose (G), nenhum biossurfactante superou a biorremediação conduzida por *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), de 78%, até mesmo o surfactante sintético SLS®, que biorremediou 76%. A suplementação com óleo residual (OG) não auxiliou o processo, sendo menos eficiente que a água.

Na Figura 3, visualiza-se que os meios formulados em presença de vinhaça (V) não geraram resultados satisfatórios. A exceção foram os isolados 35, suplementado com manipueira (VM), que gerou um potencial de recuperar 85% do óleo cru da areia de praia contaminada com petróleo, maior do que *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) e SLS®, e C2, suplementado com óleo residual de fritura (OV), com capacidade de biorremediação em torno de 65%.

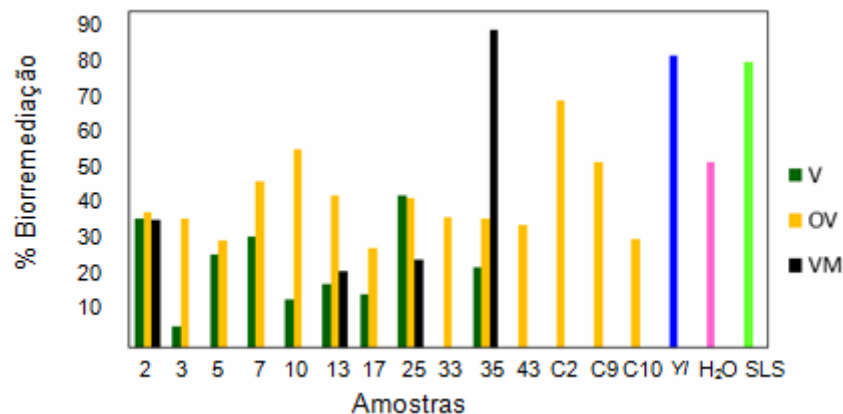


Figura 3: Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes na concentração de 1,5% (v/v) em meios de vinhaça (V), óleo + vinhaça (OV) e vinhaça + manipueira (VM).

Os resultados de biorremediação em meio com manipueira suplementado com óleo de fritura (OM) foram relevantes, comprovando mais uma vez a eficiência da suplementação como fonte

de carbono alternativa para a produção de biossurfactantes. Nesta condição, como ilustra a Figura 4, o potencial dos biossurfactantes foi maior do que quando os mesmos foram provenientes de qualquer outra formulação do meio mineral, chegando a recuperarem acima de 60% de petróleo.

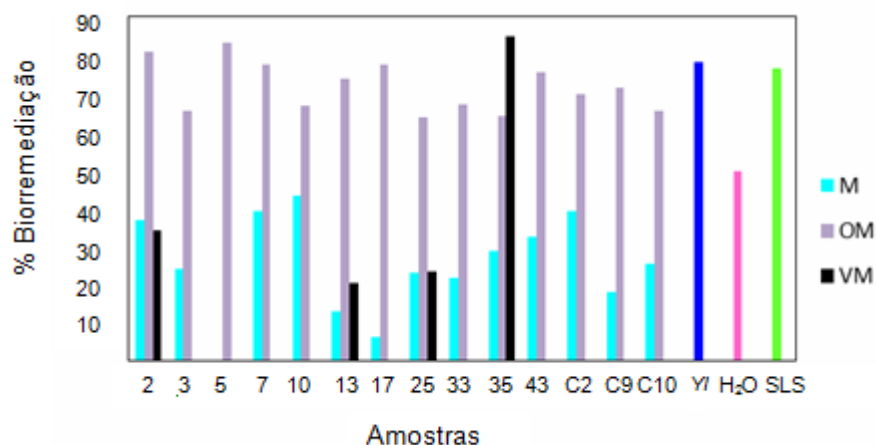


Figura 4: Potencial de biorremediação (%) dos 14 biossurfactantes na concentração de 1,5% (v/v) em meios de manipueira (M), óleo + manipueira (OM), vinhaça + manipueira (VM).

A aplicabilidade dos microrganismos em estudo no processo de biorremediação do óleo cru foi constatada, sendo sua eficiência validada quando comparado ao SLS[®] e à *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682), um microrganismo identificado na literatura como competente produtor de biossurfactante.

Estas análises foram realizadas a partir da produção mais eficiente de biossurfactante, com o resíduo agroindustrial manipueira suplementado com óleo residual de fritura como fonte de carbono, e apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Desempenho dos biossurfactantes em relação ao tipo de microrganismo em meio suplementado com óleo de fritura e manipueira.

Amostra de biossurfactantes	Tipo de microrganismo	Coloração de Gram	Potencial de biorremediação (%)
2	levedura		80,66
3	levedura		65,37
5	levedura		83,07
7	bactéria	-	77,51
10	bactéria	+	66,51
13	bactéria	+	73,82
17	levedura		77,37
25	bactéria	-	63,79
33	bactéria	-	66,94
35	bactéria	-	63,82
43	bactéria	+	75,54
C2	bactéria	-	69,61
C9	bactéria	+	71,30
C10	bactéria	+	65,25
YL	levedura		78,12
SLS [®]	---		76,38

Os biossurfactantes produzidos a partir de leveduras (2, 3, 5, 17) apresentaram potenciais de biorremediação superiores a 70% e aos de *Yarrowia lipolytica* e do surfactante sintético SLS[®], à exceção do obtido pela levedura 3. Quanto aos biossurfactantes produzidos por bactérias (7, 10, 13, 25, 33, 35, C2, C9 e C10), estas em sua maioria Gram negativas, foram obtidos potenciais de biorremediação entre 63 e 78%, sendo menos eficientes que aqueles produzidos pelas leveduras.

Tais resultados corroboram a importância de se reutilizar resíduos em processos biotecnológicos visando a produção dos sabões biológicos. Neste estudo, o biotensoativo produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, tendo a glicose como substrato, teve resultados inferiores ao de leveduras e bactérias que utilizaram a manipueira e o óleo de fritura como fonte de carbono para o processo de produção de biossurfactantes, bem como substrato alternativo para o isolamento de microrganismos.

Alcançou-se, portanto, dois focos principais neste trabalho, ou seja, o reaproveitamento da biomassa, ressaltando a importância ambiental, e a produção de biotensoativos a partir destas fontes alternativas de carbono como suplementação ao meio mineral, com propriedades de biorremediação.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a biorremediação foi favorecida pelo uso de substratos de baixo custo, óleo residual de fritura e manipueira, validando a importância da fonte oleosa como indutora na produção de biossurfactantes. A exceção se deu pelo isolado 35, uma bactéria Gram negativa, que teve um maior potencial de redução do óleo cru (85%) quando produzido a partir da mistura de vinhaça e manipueira com fonte de carbono ao meio mineral.

-
1. TONINI, R. M. C. W.; TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P. & LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v. 27 (3), p. 441-446, 2004.
 2. REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, v. 14(4), p. 1025-1035. 2010.
 3. AUTRY, A. R. e ELLIS, G. H. *Environmental Progress*, v. 11, p. 318-323, 1992.
 4. HEAD, I.M. Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology*, v.144, p.599-608. 1998.
 5. OLLIS, D. Slick solution for oil spills. *Nature*, v. 358, p. 453-454, 1992.
 6. CHA, D. K. The effect of biosurfactants on the fate and transport of nonpolar organic contaminants in porous media. *Environmental Engineering*, v.1, p. 1-17, 2000.
 7. CHRISTOFI, N & IVSHINA, I, B. 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 915-929.
 8. WOODS JR.; CHARLES E. *Examination of the effects of biosurfactant concentration on natural gas hydrate formation in seafloor porous media*. 2004. Dissertação (Mestrado). Mississippi State University, p.28.
 9. COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, v. 13, p. 85-103, 2003.
 10. KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C.; STECHEY, D.; WOOD, J.The role of nitrogen in multi organism strategies for biosurfactant production. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, v.61, p.1735– 1743, 1984.
 11. BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible use in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, v.51, p. 1-12, 1995.
 12. BICCA, C. F.; FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 30, p. 231-236, 1999.
 13. LINDLEY, N.D. HEYDEMAN, M.T. Mechanism of dodecane uptake by whole cells of *Cladosporium resinae*. *Journal of General Microbiology*, v. 132, p. 751-756, 1986.
 14. KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. Bangalore: *Current Science*, v. 77(1), p.116-126, 1999.
 15. LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.
 16. TIBURTIUS, E.R.L., PERALTA-ZAMORA, P.P, LEAL, E.S Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v. 27, n.3, p. 441-446, 2004.
 17. MORAIS, R.K.S; ABUD, A.K.S. isolamento e caracterização de micro-organismos a partir de resíduos agroindustriais para futura seleção na produção de biossurfactantes. In: I Simpósio Nordeste de Bioprocessos. Aracaju, 15 a 17 de junho de 2011.

18. HANSON, K. G.; DUSAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potencial crude oil degrading microorganism. *Biotechnology Techniques*, v. 7, p. 745-748, 2003
19. EHRLICH, G. G.;SCHROEDER, R. A; MARTIN, P. Microbial populations in a jet-fuel contaminated shallow aquifer at justin, California, U. S. Geological survey open file report, p. 85-335, 1985.
20. CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*, v.30, p. 179, 2002.
21. JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO; F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37 (4), p. 1192-1201, 2007.