

Universidade de Passo Fundo  
Faculdade de Engenharia e Arquitetura  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental

Gabriel Immich

EFICIÊNCIA DE ANELÍDEOS EM AUXILIAR A BIODEGRADAÇÃO DE  
BIODIESEL EM SOLO ARGILOSO

Passo Fundo  
2019

Gabriel Immich

Eficiência de anelídeos em auxiliar a degradação de biodiesel em solo argiloso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do grau de mestre, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Thomé

Passo Fundo

2019

Universidade de Passo Fundo  
Faculdade de Engenharia e Arquitetura  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assina e aprova a dissertação de mestrado intitulada “Eficiência de anelídeos em auxiliar a biodegradação de biodiesel em solo argiloso” elaborada por Gabriel Immich, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data de aprovação: 02/05/2019

Membros componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Thomé

Universidade de Passo Fundo – UPF

Orientador

Prof. Dra. Luciane Maria Colla

Universidade de Passo Fundo – UPF

Prof. Dr. Ivo André Homrich Schneider

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Eduardo Pavan Korf

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Prof. Dr. Cleomar Reginatto

Universidade de Passo Fundo – UPF

Passo Fundo

2019

## RESUMO

O sucesso nas técnicas de biorremediação depende de fatores como: características do local, fatores ambientais, natureza do contaminante (temperatura, pH e nutrientes), presença de genes biodegradativos adequados, natureza da contaminação, entre outros. Os anelídeos podem auxiliar nessas características, através de suas propriedades biológicas, químicas e físicas, promovendo a aeração do solo, a melhoria de sua característica nutricional, contribuindo ainda na liberação dos contaminantes aderidos nas partículas do solo, além de auxiliar na dispersão dos microrganismos degradantes. Embora haja relatos do uso de anelídeos na degradação de compostos orgânicos, como derivados de petróleo, não foram encontrados relatos da eficiência desta técnica como auxiliar na degradação do biodiesel. Objetivou-se, portanto, analisar a capacidade de anelídeos para o auxílio na remediação de um solo residual de basalto contaminado por biodiesel. Realizaram-se ensaios de toxicologia (letalidade e fuga), visando analisar a capacidade de duas espécies de anelídeos em sobreviver no ambiente contaminado (*Eisenia andrei* e *Eudrilus eugeniae*). Com base nos ensaios de toxicologia (letalidade e fuga) realizou-se ensaios de remediação na espécie que apresentou melhor resistência ao contaminante, utilizando-se esterco bovino (5g por semana por kg de solo) como bioestimulante, visando analisar a degradação do biodiesel no decorrer do tempo. Os anelídeos foram resistentes a contaminações de biodiesel até a proporção de 2% (*Eisenia andrei*) e 3% (*Eudrilus eugeniae*), porém tendem a evitar solos contaminados para concentrações acima de 1%. A *Eudrilus eugeniae* se provou a mais resistente ao contaminante, pois sua letalidade é menor em maiores concentrações de contaminante. Nos ensaios de remediação os anelídeos da espécie (*Eudrilus eugeniae*) e o esterco bovino provaram-se eficientes para processos de remediação. Os anelídeos auxiliam no processo de degradação de biodiesel em solo argiloso, obtendo-se nessas condições 100% de degradação no final dos 90 dias para as amostras com “bioestimulação e anelídeos” e “bioestimulação, microrganismos e anelídeos”, e 94% de degradação na amostra “microrganismos e anelídeos”.

**Palavras-chave:** Biorremediação, anelídeos, vermirremediação.

## ABSTRACT

Success in bioremediation techniques depends on factors such as site characteristics, environmental factors, contaminant nature (temperature, pH, nutrients), presence of suitable biodegradable genes, nature of the contamination, among others. Earthworms can aid in these characteristics, through their biological, chemical, and physical properties, promoting the soil aeration, improving their nutritional characteristics, contributing also to the contaminants release adhered to the soil particles, besides helping in the dispersion of degrading microorganisms. Although there are reports of the use of earthworms in degradation of organic compounds, such as petroleum derivatives, no reports of the efficiency of this technique as an aid in the degradation of biodiesel were found. The study objective was to analyze the ability of earthworms to aid the remediation of a soil contaminated by biodiesel. To do so, toxicology (lethality and avoidance) tests were done, aiming at analyzing the two earthworm's species (*Eisenia andrei*, *Eudrilus eugeniae*) ability to survive in the contaminated environment. With the toxicology data, remediation tests were done with the specie who presented better surviving abilities in the contaminated environment, with cattle dung as biostimulation (5g per kg of soil per week), aiming to analyze the biodiesel degradation over time. In toxicology, earthworms were resistant to biodiesel contaminations up to the proportion of 2% (*Eisenia andrei*) and 3% (*Eudrilus eugeniae*) but tended to avoid contaminated soils at concentrations above 1%. *Eudrilus eugeniae* proved to be the most suitable, since its lethality is lower in higher biodiesel concentrations. In the remediation analysis, earthworms (*Eudrilus eugeniae*) and cattle dung proved to be efficient in remediation. The earthworms improved the biodiesel degradation in clayey soil, obtaining in these conditions 100% degradation at the end of 90 days for the samples "biostimulation and earthworms", "biostimulation, microorganisms and earthworms" and 94% degradation in the sample "microorganism and earthworms".

**Keywords:** Bioremediation, Earthworms, Vermiremediation, Biodiesel.

## **AGRADECIMENTOS**

- ✓ A minha família pelo apoio durante o período e suporte financeiro.
- ✓ Ao meu orientador Dr. Antônio Thomé pela orientação e confiança e por acreditar neste trabalho.
- ✓ A minha namorada Janaína por ajudar a levantar meu espírito em momentos difíceis.
- ✓ Aos estagiário Lucas por ajudar nas atividades do laboratório, sem o auxílio o processo seria muito mais difícil.
- ✓ Aos amigos Bruna, Daniela, Felipe, Jean, João e Luciana por estarem presentes e me ajudarem sempre que precisei, vocês são uma parte importante de minha vida.
- ✓ A Deus por ter dado forças para completar este projeto.
- ✓ Aos laboratoristas por auxiliarem sempre que necessário.
- ✓ A UPF por disponibilizar os materiais e recursos necessários para a realização desta dissertação.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ações físico-químico-biológicas das minhocas no solo. ....	19
Figura 2: Evolução temporal da produção científica sobre o tema de vermirremediação. ....	20
Figura 3: Periódicos com maior número de publicações sobre o tema de vermirremediação. ....	21
Figura 4: Evolução temporal das publicações com o termo vermirremediação. ....	22
Figura 5: Fluxograma de produção do biodiesel. ....	24
Figura 6: Fonte de biodiesel no mundo. ....	25
Figura 7: Principais ésteres metílicos no óleo de soja. ....	26
Figura 8: Cromatograma de biodiesel de soja puro. ....	27
Figura 9: Hidrolise de éster por lipases. ....	28
Figura 10: Fluxograma das etapas da pesquisa. ....	31
Figura 11: Minhocários. ....	33
Figura 12: Ensaio de capacidade máxima de retenção. ....	36
Figura 13: Ambiente do ensaio. ....	38
Figura 14: Câmera de 2 secções (valores em cm). ....	39
Figura 15: Procedimento do ensaio de fuga. ....	39
Figura 16: Comportamento de fuga <i>Eisenia andrei</i> . ....	48
Figura 17: Projeção da fuga para <i>Eudrilus eugeniae</i> . ....	49
Figura 18: Letalidade para <i>Eisenia andrei</i> . ....	51
Figura 19: Gráfico de letalidade para a <i>Eudrilus eugeniae</i> . ....	52
Figura 20: Controle de peso durante o ensaio de letalidade para <i>Eudrilus eugeniae</i> . ....	52
Figura 21: Degradação do biodiesel no processo de remediação ao longo do tempo. ....	53
Figura 23: Degradação do biodiesel na remediação em diferentes periodos de tempo. ....	54
Figura 24: Curvas de degradação do biodiesel no processo de remediação (a). ....	57
Figura 25: Curvas de degradação do biodiesel no processo de remediação (b). ....	58
Figura 26: Degradação das cadeias de carbono do biodiesel ao longo do tempo (a). ....	60
Figura 27: Degradação das cadeias do biodiesel ao longo do tempo (b). ....	61
Figura 27: Letalidade ao longo da remediação. ....	63
Figura 28: Controle de peso ao longo da remediação. ....	64

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fatores ambientais significantes ao microrganismos durante processos de biorremediação. ....	15
Quadro 2: Número de ensaios e de anelídeos a serem utilizados.....	33
Quadro 3: Delineamento dos ensaios de biorremediação.....	41
Quadro 4: Relatório das características e especificações do biodiesel.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades do biodiesel de soja.....	26
Tabela 2: Anelídeos e a degradação de contaminantes derivados do petróleo.....	30
Tabela 3: pH dos substratos.....	34
Tabela 4: Caracterização do solo.....	44
Tabela 5: Caracterização química do esterco bovino .....	45
Tabela 6: Cromatografia do biodiesel analisado .....	46
Tabela 7:Taxa de fuga para a <i>Eisenia andrei</i> . .....	47
Tabela 8:Taxa de fuga para a <i>Eudrilus eugeniae</i> .....	48
Tabela 9: Aleatoriedade dos lados.....	49
Tabela 10: Influência dos anelídeos na degradação no 2 mês. ....	55
Tabela 11: Análise de cromatografia do biodiesel ao longo do processo de remediação .....	59

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1	Microrganismos em biorremediação .....	14
2.2	Anelídeos.....	16
2.3	Vermirremediação .....	18
2.3.1	Ações físico-químico-biológicas das minhocas no solo .....	18
2.4	Análise Bibliométrica.....	20
2.5	Biodiesel.....	23
2.5.1	Degradação do biodiesel em solo .....	27
2.6	Remediação de compostos derivados do petróleo.....	28
3	METODOLOGIA.....	31
3.1	Minhocário .....	33
3.1.1	Preparação dos compostos .....	33
3.1.2	Preparação dos criatórios .....	34
3.2	Solo.....	35
3.2.1	Análise física, química e microbiológica do solo .....	35
3.3	Preparação do solo .....	37
3.4	Ensaio de toxicidade .....	37
3.4.1	Ensaio de letalidade .....	37
3.4.2	Ensaio de fuga .....	38
3.5	Preparação da amostra para vermirremediação.....	40
3.6	Determinação da biodegradação .....	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	Características Físico, químico e microbiológica do solo.....	43
4.2	Biodiesel.....	45
4.3	Ensaio de toxicologia.....	47
4.3.1	Ensaio de fuga.....	47
4.3.2	Letalidade.....	50
4.4	Degradação do Biodiesel.....	53
4.4.1	Curvas de degradação .....	56

4.5	Análise cromatográfica das cadeias de carbono do biodiesel .....	59
4.6	Toxicidade da remediação aos anelídeos .....	62
4.7	Discussão dos resultados .....	64
5	CONCLUSÕES .....	67
6	RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
	REFERÊNCIAS .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

O solo pode acabar contaminado de diversas maneiras devido a ação industrial, como exemplo a indústria do petróleo e seus derivados, que em função de atividades de transporte, refino e armazenamento pode acabar em derramamentos acidentais, causando a contaminação do solo (ANDRADE et al., 2010). Neste sentido, a atividade industrial deixa uma grande quantidade de locais contaminados na periferia de áreas urbanas, que diversas vezes são solos com altas concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos (GOLDAMES et al., 2017).

O biodiesel é um combustível que tem sido estimulado mundialmente a fim de substituir a matriz energética atual, baseada no uso de combustíveis fósseis. Além disso, a produção brasileira tem aumentado, estimulada por uma legislação fomentadora da produção de biocombustíveis (BRASIL, 2016). Porém, o armazenamento e transporte deste combustível pode causar derramamentos e, por consequência, a contaminação do solo. Segundo Andrade et al (2010), os combustíveis são um dos principais problemas ao meio ambiente, pois além de contaminar os solos, pode causar a contaminação de águas subterrâneas, prejudicando aquíferos e consequentemente o abastecimento (ABDANUR; NOLASCO, 2005.; GLÓRIA, 2016).

Devido a estes problemas, técnicas que promovem a descontaminação dos solos são importantes. Estas técnicas podem ser de cunho físico, químico ou biológico, podendo ser aplicadas em conjunto, promovendo a degradação *in situ* (no local) ou *ex situ* (remoção do solo contaminado do local de origem), buscando reduzir a contaminação para níveis seguros em conformidade com a legislação. As técnicas *ex situ* são mais onerosas, porém permitem um maior controle das condições para a degradação. Entre as diversas técnicas de remediação, a biorremediação tem se destacado por sua atratividade econômica (REDDY et al, 1999; NANO et al, 2003).

A biorremediação traz uma visão de técnica com menor impacto ambiental e mais sustentável do que as técnicas tradicionais presentes no mercado (KIM et al, 2013). O sucesso do processo de biorremediação depende de muitos fatores, entre eles as características do local, fatores ambientais, natureza do contaminante (temperatura, pH, nutrientes), presença de genes biodegradativos adequados, natureza da contaminação (MAIER, 2000).

Vários métodos de biorremediação exploram a capacidade dos microrganismos de degradar eficientemente os contaminantes orgânicos associados ao solo, estes microrganismos

dependem de uma vasta gama de variáveis e condições para serem bem-sucedidos. Tais fatores acabam frequentemente limitando a eficácia da biorremediação, os fatores como a disponibilidade de oxigênio e nutrientes, a relação pH, C:N (Carbono: Nitrogênio), a presença e a atividade de microrganismos degradantes, a temperatura, o nível de toxicidade dos contaminantes, a produção de enzimas, a presença de co-contaminantes (ATLAS, 1995.; BOOPATHY, 2000; ROMANTSCHUCK et al, 2000).

Os anelídeos têm potencial de reduzir as barreiras que afetam os processos de biorremediação em um processo conhecido como vermirremediação. As minhocas podem acelerar a remoção de contaminantes do solo, por modificarem as propriedades físicas e químicas do solo, misturando-o com matéria orgânica (CHACHINA, VORONKOVA, BAKLANOVA, 2016). Estudos demonstram o potencial dos anelídeos para auxiliar a degradação de derivados do petróleo. Fernandez et al (2011) observaram um aumento de 20% na degradação de diesel pelo uso da espécie *Eisenia Fedida*. Schafer e Fisher (2007) relataram um aumento da eficiência de 180% a 460% em solos com petróleo bruto, dependendo da espécie utilizada. Somado ao ponto, Hickman e Reid (2008a) afirmam que apesar dessas características favoráveis, poucas análises utilizando anelídeos para a descontaminação do solo foram realizadas, o que demonstra a necessidade de pesquisas no meio, principalmente comparando espécies que se comportam de maneira diferenciada no solo.

Conforme o Scopus (2017)<sup>1</sup> não existe nenhum documento publicado sobre a eficiência dos anelídeos em processos de remediação de biodiesel, entretanto existe literatura sobre a sua eficiência em auxiliar a degradação de derivados do petróleo e combustíveis, como petróleo bruto e diesel (MARTINKOSKY, 2017; CHACHINA, VORONKOVA, BAKLANOVA, 2016; FERNÁNDEZ et al, 2011; HICKMAN, REID, 2008b). Além disso, existem poucas pesquisas analisando o comportamento de diferentes espécies no solo, as quais podem apresentar diferenças na eficiência de degradação e resistência a contaminação (SCHAEFER, 2005; CACHINA et al, 2015; NJOKU et al, 2017). Ainda segunda a pesquisa bibliométrica realizada, não existem estudos de vermirremediação e toxicidade em solo argiloso residual de basalto.

---

<sup>1</sup> Pesquisa realizada utilizando os termos “Bioremediation” ou “Remediation” ou “Vermiremediation” e “Earthworm” ou “Earthworms” e “Biodiesel”

Assim, pergunta-se: qual seria a eficiência dos anelídeos em degradar biodiesel em um solo argiloso residual de basalto.

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a biorremediação com auxílio de anelídeos de um solo argiloso residual de basalto contaminado por biodiesel.

Os objetivos específicos foram:

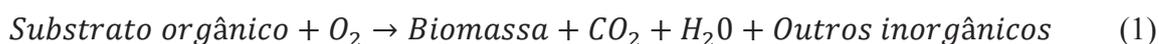
- a. Analisar se o biodiesel é tóxico às espécies analisadas em solo argiloso e determinar a espécie que tem maior adaptabilidade ao solo contaminado.
- b. Levantar quantitativamente o quanto os anelídeos auxiliaram na degradação do biodiesel.
- c. Determinar qualitativamente o quanto dos compostos foram degradados pela espécie.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Microrganismos em biorremediação

Os microrganismos têm um papel chave na geoatividade da biosfera, particularmente nas áreas de biotransformação de elementos, metais, minerais e decomposição. Os mesmos podem utilizar cadeias de produtos com C, H e O e realizarem a sua assimilação, degradação e metabolismo (GADD, 2010).

A capacidade de microrganismos em degradar contaminantes é algo conhecido, a literatura traz diversas espécies de bactérias, fungos e algas com capacidade de degradar contaminantes orgânicos, como PAHs (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) (HARITASH, KAUSHIK, 2009, ALEGBELEYE et al, 2017, REGINATTO, 2012). A degradação tem dois caminhos de acordo com a característica de respiração do microrganismo, podendo ser aeróbia ou anaeróbia. No metabolismo aeróbio a molécula de oxigênio recebe elétrons do processo de oxidação dos substratos orgânicos oxidáveis transformando O<sub>2</sub> em água (H<sub>2</sub>O) conforme Equação 1. Alguns organismos utilizam também CO<sub>2</sub> como fonte de carbono, conforme Equação 2 (USEPA, 1996). Já em locais onde ocorre falta de oxigênio, os aceptores de elétrons mudam, nitrato (NO<sub>3</sub>), ferro (Fe<sup>3+</sup>), Magnésio (Mn<sup>4+</sup>) sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) podem agir como aceptores de elétrons considerando que o microrganismo tenha as enzimas corretas (SIMS, 1990), sendo esse processo conhecido como respiração anaeróbia.



A utilização dos microrganismos na degradação de contaminantes pode ser realizada de três formas: atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação. A atenuação natural é o processo da degradação de maneira natural, sem interferência humana, somente através da interação do contaminante com o meio. A bioaugmentação é a prática de adicionar comunidades de microrganismos especializados no meio, com o objetivo de realizarem a degradação. Já a bioestimulação é a adição de agentes estimulantes, como nutrientes, oxigênio e biosurfactantes com o objetivo de acelerar o processo de degradação (BENTO et al, 2003).

A USEPA (1996) traz algumas características ambientais que afetam as condições de atividade dos microrganismos, as quais estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1: Fatores ambientais significantes ao microrganismos durante processos de biorremediação.

Fator ambiental	Condição ótima
Oxigênio	Aeróbio: Maior que 0,2 mg/L, no mínimo 10% de dos poros com oxigênio Anaeróbio: Menos que 0,2 mg/L, menos que 1% dos poros com oxigênio
Nutrientes	Sugerido C:N:P (120:10:1)
Umidade	Solo não saturado, 25 – 85% da capacidade de água.
pH	5,5-8,5
Temperatura	15-45 °C

Fonte: USEPA (1990)

Estes efeitos podem ser vistos em processos de remediação já realizados, Safdari et al (2018) comparou os processos de atenuação natural, bioestimulação com oxigênio e nutrientes, bioaumentação com microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, e a combinação das duas técnicas em um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Os microrganismos utilizados foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, os nutrientes foram uma solução de sais composta por  $\text{KH}_2\text{PO}_2$ ,  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NaCl}$ . Os ensaios duraram 60 dias e a maior taxa de degradação foi da combinação entre bioestimulação e bioaumentação com 89,7%, a degradação na atenuação natural foi de 51,4%.

Polyak et al (2018) analisou três técnicas de remediação (atenuação natural, bioestimulação, e bioaumentação) em um solo contaminado por petróleo em concentração de  $10 \text{ L m}^{-2}$  durante um período de 9 anos. Os mesmos notaram um efeito positivo tanto na técnica de bioestimulação quanto na bioaumentação, entretanto, a maior parte da degradação pode ser atribuída aos microrganismos indígenas (nativos do local), sendo a bioaumentação com efeitos positivos momentaneamente. A pesquisa indicou que a melhor estratégia para remediação de solos podzolicos é a bioestimulação.

Relacionado a processos de bioestimulação, Thomé et al (2017) analisou uma bioestimulação em solo com biodiesel durante infiltração de água da chuva. Os autores constataram que a bioestimulação e infiltração podem reduzir a capacidade do solo de reter o contaminante, permitindo espalhamento da contaminação, sendo necessário a consideração deste fato no processo de bioestimulação.

Relativo à capacidade dos microrganismos em degradar contaminantes como o diesel e biodiesel, Decesaro et al (2017) constatou um aumento na eficiência da degradação através da bioestimulação com três fontes: ficocianina, biomassa inativa da *Spirulina platensis* e sulfato de amônia durante um período de 60 dias. Os valores de degradação chegaram a 88,75% para o biodiesel para a bioestimulação com ficocianina, e 64,89% para o diesel pelo uso da biomassa da *S. platensis*. A atenuação natural alcançou valores de 42,4% (biodiesel) e 31,3% (diesel).

A utilização de bioestimulação com lipídios da *Spirulina platensis* também foi realizada por Schmitz et al (2015), extraindo os lipídios da alga aplicando-os no processo de remediação durante 60 dias. A degradação alcançou valores de 81,9% (biodiesel) e 81,7% (diesel) na degradação, comparado a 54,36% (diesel) e 30,09% (biodiesel) da atenuação natural.

## 2.2 Anelídeos

Segundo Lee e Foster (1991), a fauna do solo inclui desde anelídeos que podem chegar a mais de 1 metro de comprimento e 2 cm de diâmetro, pesando mais que 500 gramas a pequenos protozoários flagelados com 5  $\mu\text{m}$  de comprimento, pesando menos que  $10^{-10}$  g. A macrofauna do solo é responsável por afetar significativamente a estrutura do solo, movendo partículas e as transformando. Dentro da macrofauna um dos principais organismos que a compõem são os anelídeos, Darwin (1881) já reconhecia as minhocas com um fator importante no processo de formação do solo.

As minhocas habitam normalmente as camadas superficiais de solo, chegando até profundidades de 30 cm a 50 cm (BROWN, JAMES, 2007). Em questão de comportamento, existem dois padrões quando se trata da escavação do solo por anelídeos, algum dos caminhos são as “casas” os quais são abertos até a superfície onde a comida é coletada, já outros são temporários e criados enquanto elas se deslocam em busca de comida (LEE FOSTER, 1991). As minhocas enterram matéria orgânica da superfície enquanto trazem partículas de solo das camadas mais profundas (BLOUIN et al, 2013).

As minhocas podem ser classificadas de acordo com seus tipos de atividade no solo em epigeica, anécicas e endogeica. As de espécie epigeica vivem bem próximo a superfície e produzem resíduos que afetam a rugosidade e distribuição dos macroporos no solo. As de espécie anécicas costumam viver em tocas verticais, ligando os abrigos a superfície do solo. As

de espécie endogêica criam túneis aleatórios e temporários que raramente são reusados (BOUCHÉ, 1977; LEE, 1985).

Apesar de todas as características positivas para a estrutura do solo e aumento da microfauna do solo (OADES, 1993; BROWN, 1995; BLOUIN et al, 2013), Migge-Kleian et al (2006) reportam que a introdução de espécies não nativas pode causar impactos negativos ao local, através da competição por comida e recursos podendo gerar um declínio da micro e mesofauna do solo.

No mundo existem cerca de 8.800 espécies conhecidas de anelídeos (REYNOLDS, WETZEL, 2007) e no Brasil existem 310 espécies catalogadas. Steffen (2012) fez uma análise sobre a diversidade de minhocas nos ecossistemas naturais e alterados no Rio Grande do Sul, no qual compilou as espécies de anelídeos indígenas e as invasivas no estado.

As minhocas se alimentam de material orgânico em diferentes estágios de decomposição (LEE, 1985), porém, a maioria das espécies também consome algum tipo de mineral (DOUBLE et al, 1997). A preferência por comida pode variar de espécie para espécie, Neilson e Boag (2003) ao analisarem a preferência de seis espécies de minhocas por diferentes tipos de plantas na alimentação, verificaram que a *Lumbricus terrestris* prefere a matéria decomposta de *Poa annua* (cabelo de cão), já a *Octolasion cyaneum* preferiu o solo, as outras espécies não demonstraram preferência. Há também uma certa tendência dos anelídeos preferirem alimentos contaminados por microrganismos (MOODY et al, 1995; COOKE, LUXTON, 1980). Segundo Schmidt et al (2003) algas também constituem parte da dieta destes anelídeos, que observou a capacidade das minhocas em assimilar C de algas da superfície do solo.

Curry e Schmidt (2007) fazem um compilado da literatura a respeito dos índices de ingestão de comida por diferentes tipos de anelídeos, demonstrando que as taxas de ingestão de matéria orgânica variam de acordo com as condições do ambiente, atividade do anelídeo, qualidade do alimento e paleatividade. Apesar da grande variabilidade de alimentos e a significativa atividade enzimática no sistema digestivo das minhocas, não é claro o quanto desta atividade é de origem dos anelídeos e qual parcela e devido a microflora presente dentro do sistema (CURRY, SCHMIDT, 2007).

## 2.3 Vermirremediação

A utilização de minhocas em processos de remediação (vermirremediação) tem como objetivo melhorar a aeração do solo e também tornar os contaminantes disponíveis para os microrganismos. Além disso, a exposição dos microrganismos às condições do aparelho digestivo da minhoca gera aumento da atividade dos mesmos (MARTINKOSKY et al, 2017). À medida que o solo passa através do seu trato digestivo, as enzimas e surfactantes são secretados, as partículas são moídas e o muco fornecendo açúcar estimula a atividade microbiana (MARTINKOSKY et al, 2017.; FERENHORST et al, 2001.; DOMINGUEZ, 2004.; MCKENZIE, DEXTER, 2004.;).

Aliado a isso, as minhocas são altamente adaptáveis, têm grande capacidade reprodutiva e têm tolerância e resistência a poluentes orgânicos. (HICKMAN, REID, 2008a, LANGDON et al, 2003). Na literatura, o uso da minhoca para auxiliar a biorremediação pode ser visto em solos contaminados com produtos do petróleo (MARTINKOSKY et al, 2017, HICKMAN, REID, 2008b; CHACHINA et al 2015), bem como na biorremediação de herbicidas, inseticidas, PAHs, e aromáticos clorados (HICKMAN, REID, 2008a, LIN et al., 2016a, LIN et al., 2016b). Além disso, as minhocas podem ser usadas para remover o metal tóxico do solo, fixando-o em seus tecidos (EKPERUSI, AIGBODION, 2015; PATTNAIK, REDDY, 2012), processo denominado de bioacumulação.

### 2.3.1 Ações físico-químico-biológicas das minhocas no solo

Um dos pontos importantes em um processo de biorremediação é melhorar e manter a umidade do solo, aprimorar os níveis de oxigênio e nutrientes e fazer com que os mesmos se distribuam de maneira homogênea no solo. Os solos, principalmente os mais profundos, compactados ou ricos em argila geram dificuldades neste ponto. As minhocas através da locomoção no solo geram caminhos, os quais servem de guias para a movimentação de água e partículas, facilitando o contato dos microrganismos presentes no solo com o contaminante (HICKMAN, REID, 2008a; DOMINGUEZ, 2004).

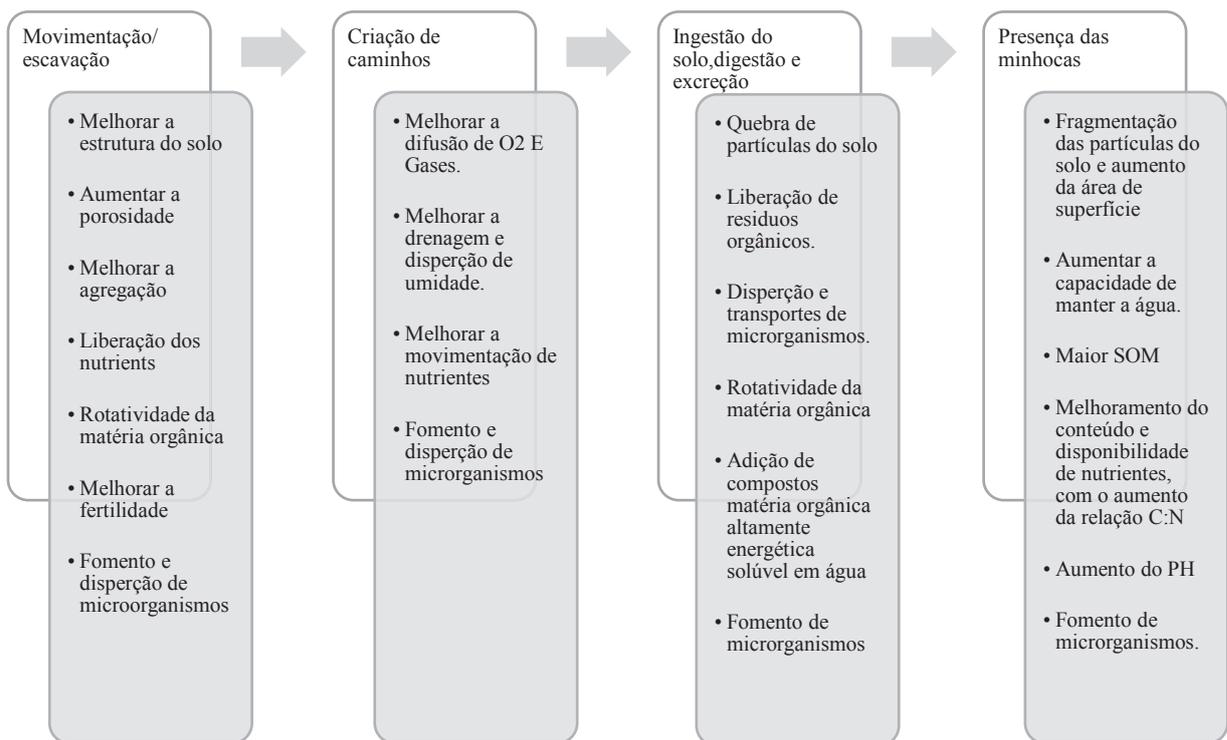
A ingestão do solo pelas minhocas e conseqüentemente a sua digestão causa a redução e fracionamento da matéria orgânica, liberando contaminantes agregados ao solo e aumentando a área de contato do material com microrganismos (MARTIN, 1991; BOROIS et al., 1993

;MCKENZIE, DEXTER, 2004 ; DOMINGUEZ, 2004). Somado a isto, a ingestão e consequente excreção melhora a fertilidade do solo através da aceleração da decomposição da matéria orgânica, e melhora a disponibilidade de nutrientes (LAVELLE et al, 2004).

A passagem do solo pelo sistema digestivo da minhoca aumenta potencialmente a biodisponibilidade, aumentando a perda de compostos pela mineralização microbiana (GEVAO et al, 2001; MARTINSKOSKY et al, 2017). O aumento do número de microrganismos, diversidade e atividade estão também relacionados da passagem deles pelo sistema digestivo (BROWN, DOUBE, 2004; MARTINKOSKY et al., 2017).

A pré-exposição de microrganismos a contaminantes dentro do sistema digestivo aumenta os índices de degradação, portanto esse processo pode ajudar os microrganismos a quebrar compostos orgânicos mais complexos (REID et al, 2002; BROWN, DOUBLE, 2004; LEVELLE et al, 1993). As ações discutidas acima encontram-se resumidas na Figura 1.

Figura 1: Ações físico-químico-biológicas das minhocas no solo.



Fonte: adaptado de Hickman e Reid (2008a)

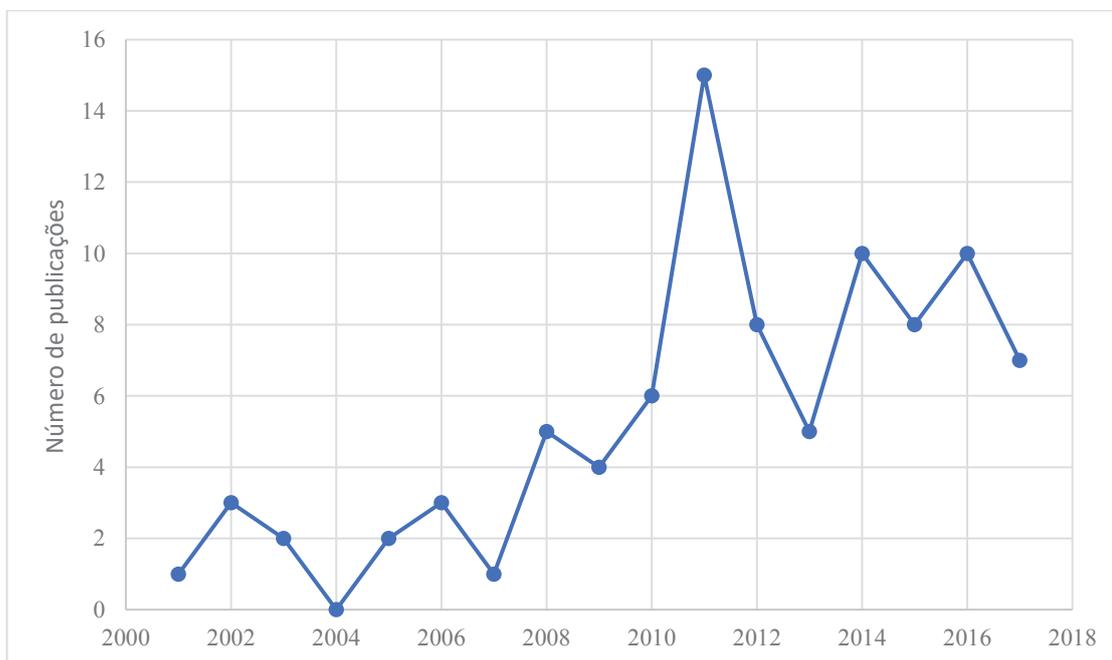
## 2.4 Análise Bibliométrica

Através da plataforma Scopus (2017) se realizou uma busca bibliográfica, almejando um levantamento de quantidade de documentos anexados a plataforma sobre o tema de biorremediação. As palavras chaves utilizadas foram: *Earthworm* ou *Earthworms* e *bioremediation*.

Uma busca inicial retornou 330 documentos sobre o assunto, porém, grande parcela se referia a ensaios de toxicidade com anelídeos e não do processo para remediação em si. Através de uma leitura inicial dos resumos, reduziu-se o volume para 130 documentos os quais utilizavam de anelídeos para o processo de degradação ou bioacumulação do contaminante, seja em solo, lodo, direto ou indiretamente.

Novamente, se realizou uma nova leitura, esta vez selecionando somente publicações que tratassem diretamente do processo de remediação com anelídeos em solos, totalizando 90 documentos.

Figura 2: Evolução temporal da produção científica sobre o tema de vermiremediação.



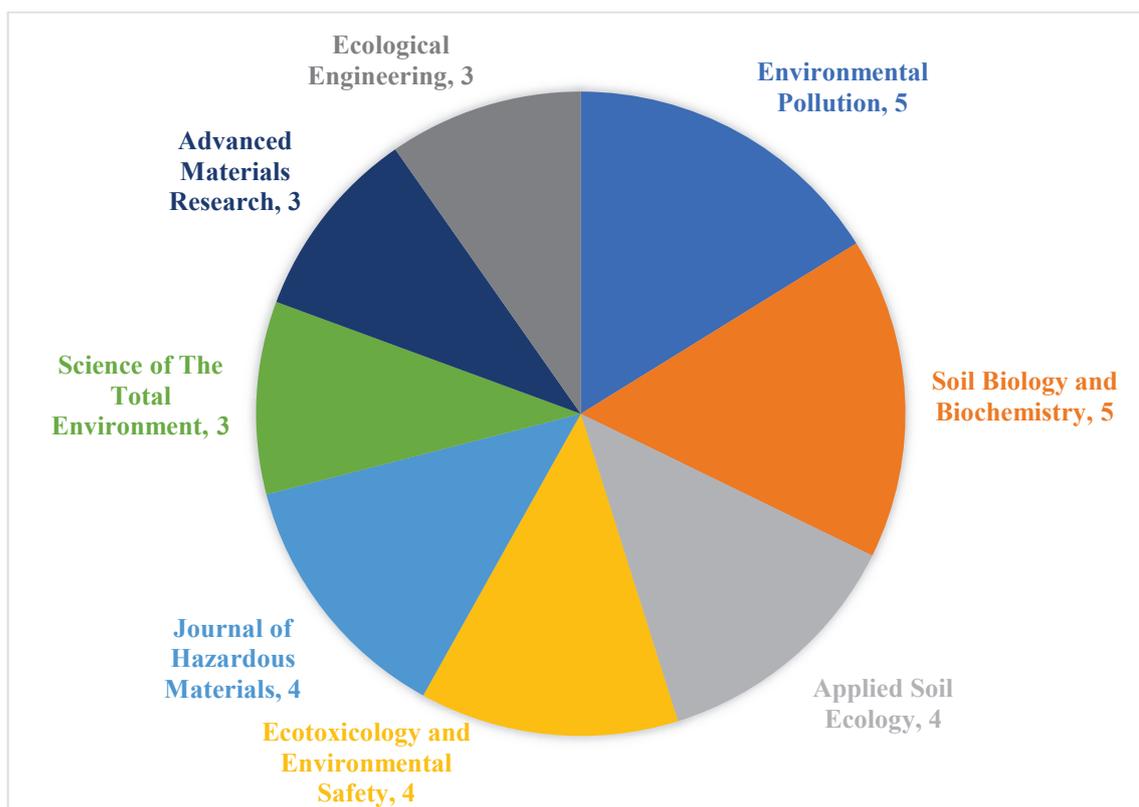
Fonte: Adaptado de SCOPUS (2017)

A primeira publicação anexada ao Scopus sobre o tópico foi de Singer et al (2001), o tema, conforme demonstrado na Figura 2, aparece em constante crescimento, com a média de

publicações anuais crescendo a partir de 2008, tendo o seu pico em 2011 com 15 artigos, em 2017 até o mês de setembro 7 publicações existiam sobre o assunto.

Analisando os meios de publicação, as revistas que mais publicaram sobre o assunto encontram-se na Figura 3.

Figura 3: Periódicos com maior número de publicações sobre o tema de vermirremediação.



Fonte: Adaptado de SCOPUS (2017)

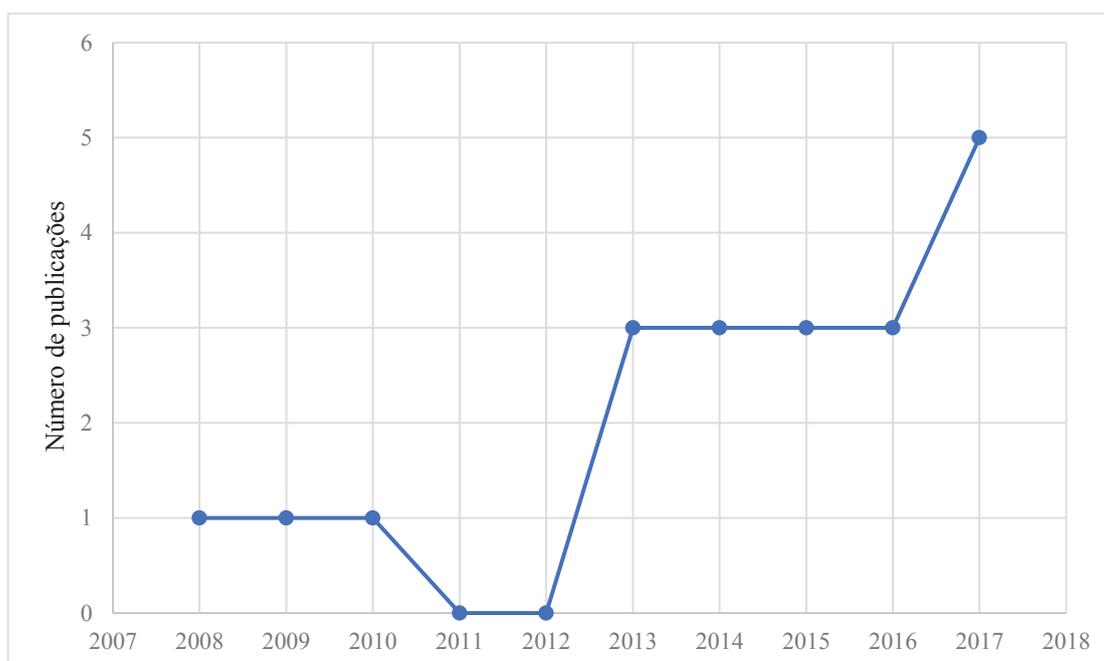
As principais publicações são “*Effects of biochar and the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements*” com 117 citações de Gomez-Eyles et al (2011), a segunda publicação, a qual é a mais antiga anexada pelo Scopus (2017) sobre o tema é de Singer et al. (2001) denominada “*Contribution of Earthworms to PCB bioremediation*” com 74 citações, finalmente a terceira é “*Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants*” uma revisão bibliográfica sobre o tema de Hickman e Reid (2008a) com 69 citações.

Os principais autores sobre o tema são Masciandaro, G. com 6 artigos publicados, Dendooven, L. e Doni, S. cada um com 5 publicações. Em questão de importância, o principal artigo de Masciandaro, G e Doni, S é “*Soil bioremediation: Combination of earthworms and*

*compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil*” (CECCANTI et al, 2006) com 52 citações, a principal publicação de Dendooven, L é “*The earthworm *Eisenia Fetida* accelerates the removal of anthracene and 9, 19-anthraquinone, the most abundant degradation product, in soil*” com 15 citações (COUTIÑO-GONZÁLEZ et al, 2010).

Atualmente, vem sendo usado um termo para a utilização dos anelídeos no processo de remediação, denominado de vermirremediação, porém, a utilização do termo não é comum a todos os documentos publicados sobre o assunto, principalmente os mais antigos. A Figura 4 mostra a redução nos resultados, porém, o uso de um termo facilitaria muito a busca por publicações na área, pois diferencia a técnica, e elimina artigos de remediação que utilizam anelídeos em outras áreas, como por exemplo, toxicologia.

Figura 4: Evolução temporal das publicações com o termo vermirremediação.



Fonte: Adaptado de SCOPUS (2017)

## 2.5 Biodiesel

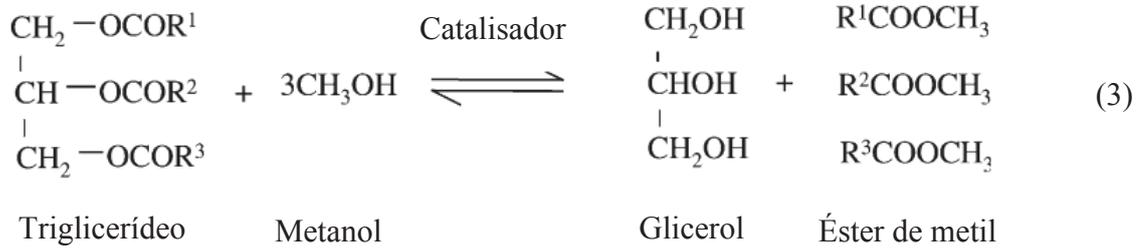
A tentativa de utilização de biocombustíveis já existe a mais de 100 anos, desde o princípio do motor a Diesel, seu inventor Rudolpg Diesel testou óleo de amendoim em um motor de ignição por compressão (SHAY, 1993). O biodiesel é uma oferta importante quando se trata de combustíveis, pois é mais biodegradável, menos tóxico e diminui em 75% a emissão de partículas comparado ao diesel, com um total de hidrocarbonetos da exaustão até 93% menor (ALI, HANNA, CUPPETT, 1995).

O Brasil apresenta programas de incentivo à produção e uso de biodiesel, entre tais incentivos, podemos citar a Lei nº 11.097 a qual introduziu o combustível na matriz energética brasileira, a normativa introduzia porcentagens de biodiesel para serem misturadas ao diesel. A lei foi alterada pela Lei nº 13.263 a qual torna obrigatório o uso de 10% de biodiesel ao diesel a partir de março de 2019 (BRASIL, 2005, BRASIL, 2016).

O biodiesel tem em sua composição etil e metil ésteres de ácidos graxos com baixa complexidade, derivado do oleato, palmitato, estearato, linoleato, miristato, laureado e linolenato, derivados de diferentes fontes de óleo vegetal (PINTO et al, 2005). Já o diesel é formado por cadeias longas de carbono, contendo 2000 a 4000 hidrocarbonetos com uma mistura complexa de cadeias normais, ramificadas e cíclicas de alcanos e compostos aromáticos, os quais são obtidos através da destilação do petróleo (GALLEGO et al, 2001).

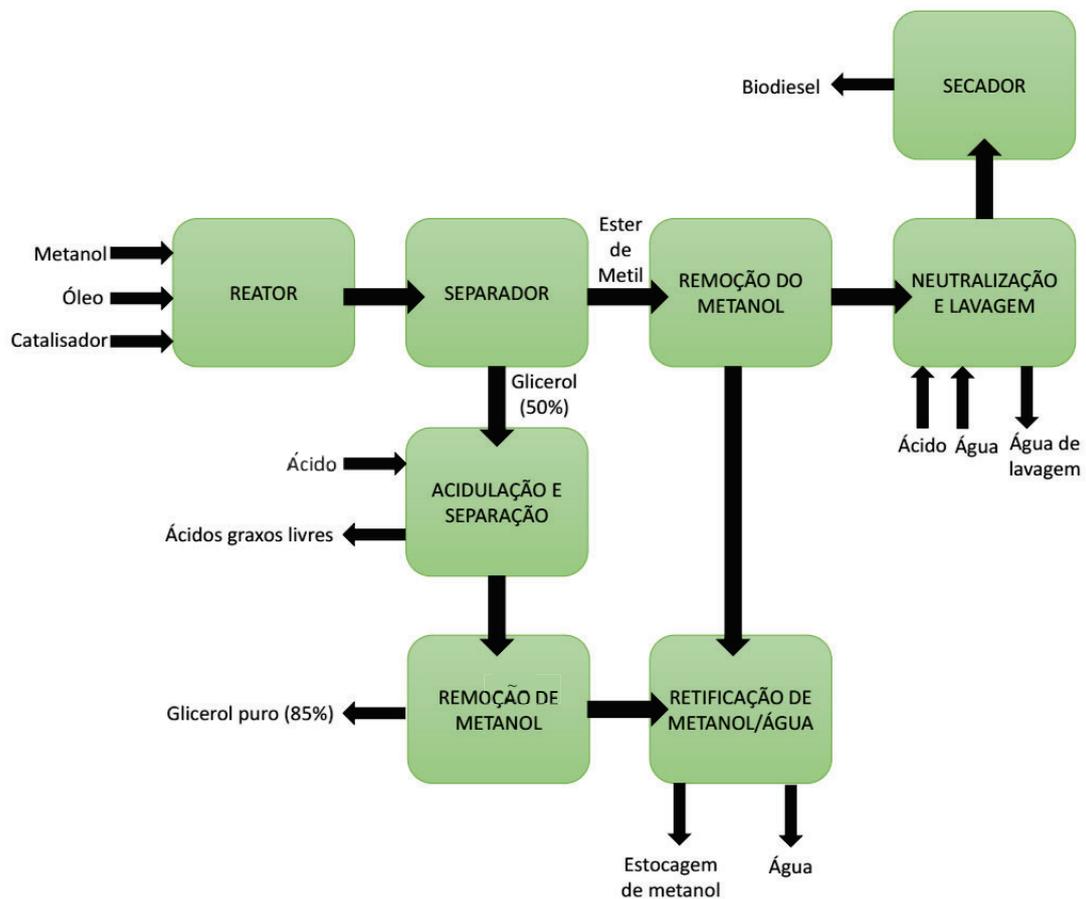
As fontes de triglicerídeos para a produção de biodiesel são óleos vegetais ou sebo animal, transformado através de processos de transesterificação. O óleo derivado de plantas, microalgas e sebo animal contém ácidos graxos livres, fosfolipídios, esteróis, água e outras impurezas, tais componentes impedem que o óleo seja usado diretamente como combustível, o processo de transesterificação, pirolise e emulsificação corrigem estes detalhes (MEHER, SAGAR, NAIK. 2004, KHAN et al, 2017, RODRÍGUEZ et al, 2017).

Entre esses, o processo de transesterificação é o mais importante, ele consiste na troca de um álcool de um éster por outro, a equação geral encontra-se na Equação 3 (MEHER, SAGAR, NAIK. 2004)



Relativo à produção, o processo geral da cadeia é documentado por Gerpen (2005), a esquematização se apresenta na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma de produção do biodiesel.



Fonte: Adaptado de Gerpen (2005)

Já em relação a origem, Jahirul et al (2013) analisou as diversas localidades e suas fontes para a produção do biodiesel, as principais fontes encontram-se na Figura 6. Na América do Sul, as principais fontes são soja, algodão, pimenta e palmeira.

Portanto, a escolha do biodiesel derivado da soja como contaminante é justificada por ser um produto comum do Brasil, complementar a isto, a literatura traz dados sobre a composição do biodiesel a partir da soja. Alli, Hanna e Cuppet (1995) já em 1995 analisaram a composição do mesmo, Barnwal e Sharma (2005) e Sandford et al (2009) também realizaram análises de composição, os resultados apresentam-se na Tabela 1. A composição do biodiesel de soja varia em alguns aspectos, o método de produção e a procedência da planta altera sua composição, apesar disso, a bibliografia apresenta certa homogeneidade nos valores.

Figura 6: Fonte de biodiesel no mundo.



Fonte: Adaptado de Jahirul et al (2013)

A sua estrutura molecular é documentada por Chiranda (2011), sendo que os principais ésteres metílicos que compõem o óleo de soja, por apresentarem cadeias longas, densidade relativa menor que a água e características hidrofóbicas, resulta em um produto que permanece na superfície quando em contato com meios aquosos, sua estrutura pode ser vista na Figura 7.

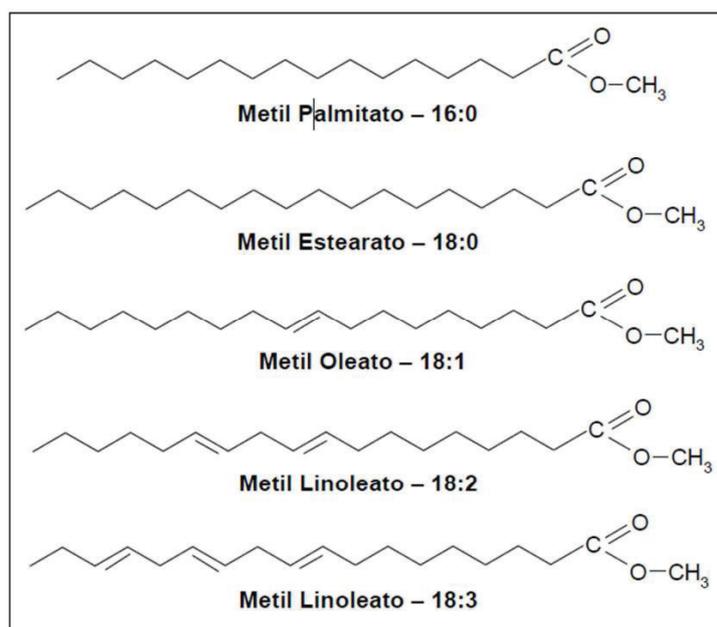
Demello et al (2007) documentou um cromatograma típico do biodiesel derivado de soja, o qual demonstra o típico tempo de retenção dos diferentes compostos presentes no combustível, o mesmo encontra-se na Figura 8.

Tabela 1: Propriedades do biodiesel de soja.

Propriedades do combustível	Óleo de soja	Biodiesel de soja	Etanol	Diesel	Óleo de soja	Biodiesel de soja	Diesel	Biodiesel de soja
Viscosidade, mm/s 40°C	28,05	4,06	0,91	2,07	28,87	4,039		4,439
Densidade kg/m <sup>3</sup>					913,8	884	859	
Gravidade específica 15,5°C	0,926	0,887	0,7947	0,8383				
Índice de Caetano	38,9	51,61		50,34	37,9	45	50	51,61
Energia kJ/kg	39,28	40,08	28,322	45,509	39,6	33,5	43,8	40,08
Ponto de derretimento	-3,5	-3		<-10				-3
Ponto de nuvem	-9	3		-15	-3,9	1		3,4
Ponto de fluidez	-16	-7		-28	-12,2	-7	-16	
Ponto de inflamação	174	127		54	254	178	76	>160
Volume de água		<0,05		<0,05				<0,005
Volume de enxofre		<0,05		0,24				
Volume de cinzas	0,12	<0,01	<0,005	<0,001				0,005
Resíduo de carbono	4,01	1,74		0,18				0,035
Valor de acidez, mg KOH/g		0,29		0,23				0,027
	Ali, Hanna e Cuppet				Barnwal e Sharma			Sanford et al

Fonte: Ali, Hanna e Cuppet (1995), Barnwal e Sharma (2005), Sanford et al (2009)

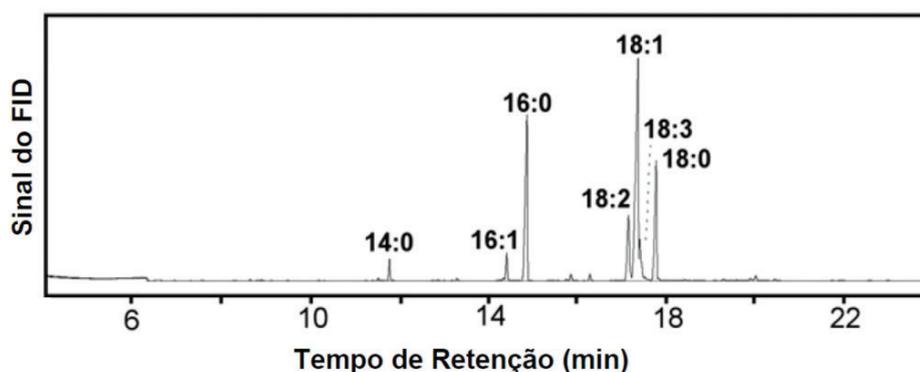
Figura 7: Principais ésteres metílicos no óleo de soja



Fonte: Chiaranda (2011)

Devido a sua estrutura química e suas características de origem, o biodiesel é um produto mais biodegradável e menos tóxico que o diesel, Lapinskiene et al (2006) demonstrou que o diesel é considerado tóxico a uma concentração de apenas 3%, já o biodiesel alcança valores de até 12%. Complementar a isto, Peterson e Reece (1994) demonstraram que a toxicidade do diesel foi 15 vezes maior que o biodiesel para a *Dophtia magna*. Em termos gerais o biodiesel é menos tóxico aos microrganismos que o diesel e é mais facilmente degradado (HOWROT-PAW, MARTYNUS, 2011, MARIANO et al, 2008, LAPINSKIENÉ ET AL, 2006).

Figura 8: Cromatograma de biodiesel de soja puro.



Fonte: Demello et al (2007)

### 2.5.1 Degradação do biodiesel em solo

Quando ocorre o derramamento de biodiesel em solo, o mesmo se move pela zona não saturada através dos mecanismos de força gravitacional e capilar. Características como umidade, propriedades de sua composição e características do solo afetam o potencial da capilaridade (GUIGUER, 2000).

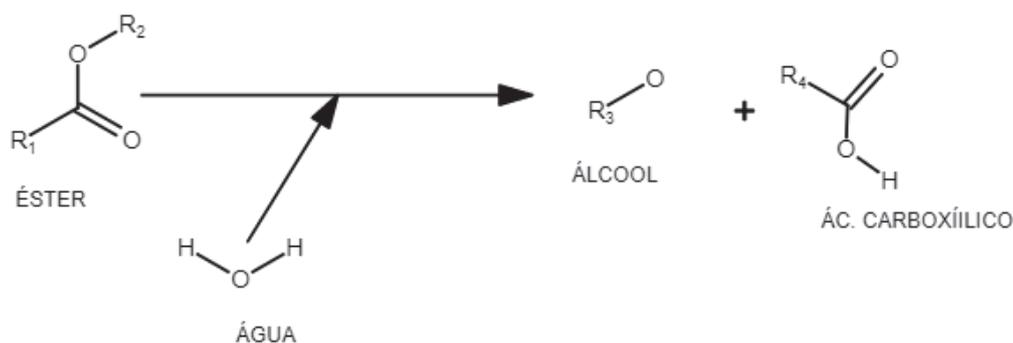
Onde ocorre um derramamento há contato com a fauna presente, diversas vezes causando o extermínio da biota, entretanto organismos que apresentarem resistência a contaminação podem acabar por utilizar, caso tenham as enzimas necessárias, o carbono presente no contaminante como fonte de energia, iniciando o processo de biodegradação do contaminante orgânico, processo explicado no item 2.1.

A degradação é afetada pelo ambiente, algumas variáveis que afetam esse processo encontram-se discutidas no item 2.1, porém vale salientar que em relação a temperatura,

quando se trata dos óleos, a baixas temperaturas a viscosidade aumenta e a volatilização de componentes tóxicos reduz, diminuindo assim a biodegradação (ATLAS, BARTHA, 1972). A temperatura ideal para a degradação é entre 30 e 40 °C (BOSSERT, BARTHA, 1984).

Em relação ao biodiesel, o processo de degradação ocorre através de enzimas extracelulares dos microrganismos, as quais tem capacidade de hidrolisar ligação de ésteres (lipases e esterases) formando álcoois e ácidos graxos, conforme Figura 9. O processo pode ser dividido em quatro etapas: primeiro, o substrato é ligado a uma serina ativa, dando uma estabilidade tetraédrica temporária devido aos resíduos catalíticos, após o álcool é liberado formando um complexo acetil-enzima. A terceira etapa é um ataque de um nucleofílico o qual transforma-o em um intermediário tetraédrico, que após convertido forma o produto (ácido ou éster) e uma enzima livre (BORNSCHEUER, 1999).

Figura 9: Hidrolise de éster por lipases



Fonte: adaptado de Santos (2009).

As lipases se diferenciam das esterases por serem responsáveis por hidrolisar as cadeias de ácidos graxos, e por necessitar uma quantidade mínima de concentração do substrato para que uma grande atividade ocorra, ao contrário das esterases que obedecem a cinética clássica de Michaelis-Menten e hidrolisam ésteres simples de no máximo C<sub>6</sub>. Tal comportamento se dá pelo fato de as lipases terem um domínio hidrofóbico (lid) cobrindo a parte catalítica das lipases, somente na presença de uma concentração mínima de substrato, o lid se move, deixando a parte ativa acessível (BORNSCHEUER, 2002).

## 2.6 Remediação de compostos derivados do petróleo

Como exemplos da utilização de minhocas em processos de biorremediação na literatura, podemos citar Cachina, Voronkova e Baklanova (2016) o qual realizou um estudo da

utilização da espécie *Eisenia fetida* para a biorremediação de solos contaminados com petróleo e diesel. Além dos anelídeos, foi utilizado no solo as bactérias fixadoras de nitrogênio *Azotobacter* e *Clostridium*, a levedura *Saccharomyces*, os fungos *Apergillus* e *Penicillium*, e a *Actuibinycetakes*. Como resultados teve-se uma redução dos hidrocarbonetos em 99% após 22 semanas com uma concentração de 20-60 g/kg de petróleo com um índice de sobrevivência das minhocas de 90 a 100%. No solo contaminado com diesel 40 g/kg, 30% das minhocas morreram após 14 dias devido ao impacto tóxico do diesel, a adição da biopreparação Baykal-Em não afetou significativamente o processo de biorremediação.

O processo também foi utilizado por Martinkosky et al (2017) que utilizaram a espécie *Eisenia fetida* em processos de remediação de solos arenosos impactados por petróleo. A pesquisa constatou que a toxicidade do ambiente para os anelídeos foi mais intensa em solos com hidrocarbonetos leves do que com contaminação com alta proporção dos hidrocarbonetos pesados poliaromáticos e alifáticos. Óleo pesado (mistura de composições de petróleo) foi adicionado em uma concentração de 30 g/kg e a degradação foi analisada em amostra com anelídeos e bioestimulação, somente bioestimulação, e sem adições. As taxas de degradação foram 90 mg/dia e 20 mg/dia após 200 dias para as amostras com anelídeos e 40 mg/dia para as com somente o bioestimulante. A toxicidade foi média nos três primeiros meses para os anelídeos.

Hickam e Reid (2008b) pelo uso da *Dandrobaena Veneta* em solo contaminado com diesel, notaram que a mesma auxiliou a quebra de PAHs quando utilizada em conjunto com resíduos orgânicos urbanos. Uma compilação da bibliografia sobre a utilização das minhocas em processos de remediação de compostos do petróleo pode ser vista na Tabela 2, a espécie mais utilizada é a *Eisenia fétida* e a *Eisenia andrei* devido as suas disponibilidades, pois são uma espécie comum utilizada em processos de compostagem.

A eficiência dos anelídeos em degradar compostos orgânicos depende do contaminante utilizado, da espécie e da fonte de alimentação (bioestimulação) do meio (SHAEFER, 2005; NJOKU et al, 2017). Os anelídeos apresentam moderada resistência aos contaminates orgânicos, podendo ser usados em processos de remediação.

Nesta revisão de literatura sobre degradação, além dos derivados de petróleo procurou-se pesquisas de vermirremediação de biodiesel, porém não foi encontrada nenhuma literatura sobre o assunto.

Tabela 2: Anelídeos e a degradação de contaminantes derivados do petróleo

Anelídeo	Espécie	Quantidade	Contaminante	Concentração (g/kg)	Tempo (dias)	Material orgânico	Remoção		Referência
							C/ Anelídeos	S/ Anelídeos	
Epigeico	<i>E. Fetida</i>	10	Diesel	1,014	90	Nenhum	43-52	30=34	Fernández et al. (2011)
Anécica	<i>E. Fetida</i>	10							
	<i>A. Chilorotica</i> <i>L. Terrestris</i>	10 10	Petroleo bruto	9,5	28	Estercos Bovino (0,6%)	31	17	Schaefer e Filser (2007)
Epigeica	<i>E. Fetida</i>	10					37	19	
Endogeica	<i>Allolobophora chlorotica</i>	10	Petroleo bruto	10	28	Estercos Bovino (0,5%)	18	17	Schaefer (2005)
	<i>L. Terrestris</i>	10					42	17	
Epigeico	<i>E. Fetida</i>	10	Lodo de refinaria de petroleo		90	Resíduos Orgânicos Urbanos (10%)	5700 mg/g TPH <sup>C</sup>	9538mg/g TPH <sup>C</sup>	Ceccanti et al. (2006)
Epigeico	<i>E. Fetida</i>	4	Petroleo bruto		150	Nenhum e palha	S/ efeito	S/ efeito	Callaham et al. (2002)
Epigeico	<i>E. Fetida</i>	10					96:92:77:90	0 <sup>a</sup>	
Epigeico	<i>D. Veneta</i>	10	Óleo de motor	20:60:80:100	120	Nenhum	99,9:95:94:80	0 <sup>a</sup>	Chachina et al. (2015)
Epigeico	<i>E. Andrei</i>	10					72:70:77:94	0 <sup>a</sup>	
Epíndogeico	<i>Hyperiodrilus africanus</i>	10	Petroleo bruto	5ml/kg	90	Estercos Bovino (50g/kg)	68,29	11,87	Ekperusi e Aigbodion(a) (2015)
Epigeico	<i>E. Fetida</i>	10	Óleo pesado	30	150	polpa de cenoura e café gasto	45 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	Martinkosky (2017)
Epigeico	<i>Eudrilus eugeniae</i>	10	Diesel	5ml/kg	90	Estercos Bovino (50g/kg)	84,99b	16,41 <sup>b</sup>	Ekperusi e Aigbodion (b) (2015)
Epigeico	<i>E. Fetida</i>	10	Petroleo	20:40:60	154	Nenhum	96:98:97	70/62/60	Chachina et al. (2016)
		10	Diesel	20:40	154	Nenhum	97:88	77/82	
Epigeico	<i>Dendrobaena veneta</i>	10	Diesel	10	84	Resíduos orgânicos Urbanos (0%,50%,100%,200%,400%)	77:87:93:96:98	43:81:88:90:95	Hickman e Reid (2008)
Epigeico	<i>Eudrilus eugeniae</i>	10					88,50:81,75:77,23		
Anécica	<i>Lumbricus terrestris</i>	10	Petroleo bruto	2,19:1,67:1,38	30	Nenhum	76,42:71,63:69,96	21,9:28,44:25,10	Njoku, Nomba e Olatunde (2017)
Epigeico e Anécica	<i>E. eugeniae</i> e <i>L. terrestris</i>	10					73,06:66,08:65,32		

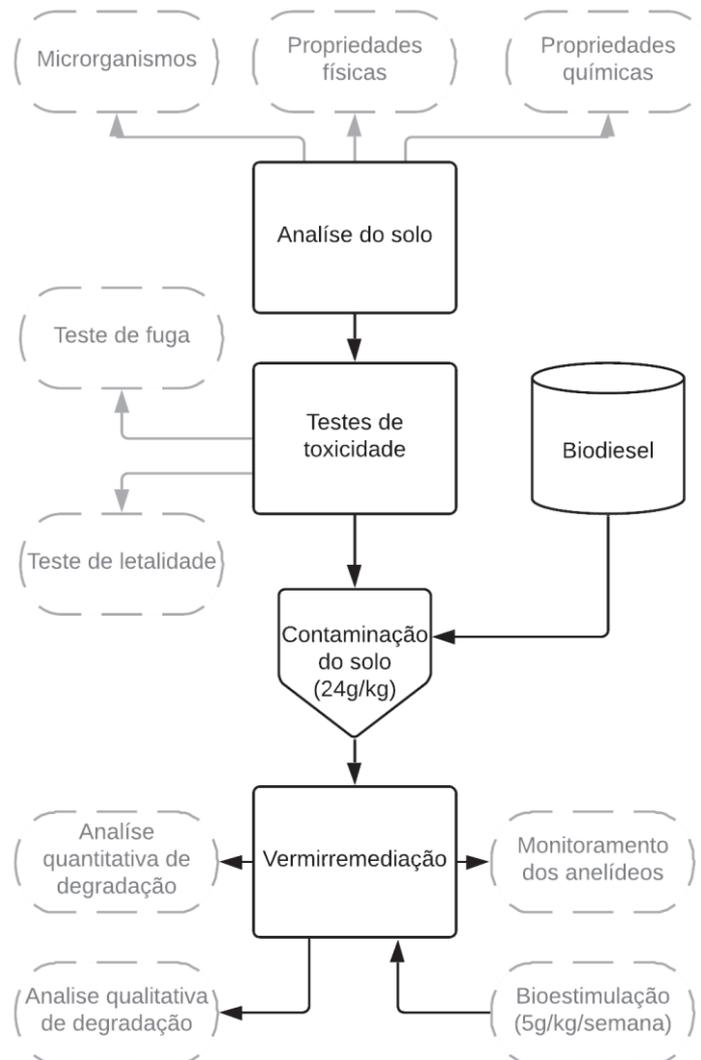
<sup>a</sup> O autor afirma que a degradação do controle foi próxima a 0 <sup>b</sup> Valores referentes ao TPH, para os metais no diesel verificar o autor. <sup>c</sup> Concentração final <sup>d</sup> Degradação em relação ao controle no final do período

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo encontra-se delimitado o planejamento experimental e a descrição dos procedimentos que foram realizados durante a pesquisa.

O fluxograma da pesquisa é apresentado na Figura 10.

Figura 10: Fluxograma das etapas da pesquisa.



Fonte: Elaborado pelo autor

Primeiramente, antes do início das etapas de pesquisa demonstradas no fluxograma da Figura 10, foi realizada a criação de minhocários. Estes minhocários tiveram como função

manter o desenvolvimento e sobrevivência dos anelídeos que seriam posteriormente utilizados na realização da pesquisa. A criação do minhocário esta descrita no item 3.1.

Após a criação do minhocário foi realizada a caracterização física, química e microbiológica do solo que seria utilizado nos ensaios de toxicologia e remediação, estando descrita no item 3.2. Paralelo a isso, deu-se uma seleção primária dos anelídeos para o processo de vermirremediação, tomando como critérios das espécies: a capacidade de reprodução, sobrevivência, adaptação a mudanças de temperatura, sua disponibilidade, e capacidade de auxílio na degradação de compostos orgânicos.

Para essa triagem inicial foi utilizado os dados de pesquisas já realizadas com anelídeos em processos de degradação de contaminação orgânica, as quais estão descritas nos itens 2.2 e 2.3.

A partir de uma triagem inicial, observando os critérios acima listados, foram selecionadas duas espécies (*Eisenia andrei* e *Eudrilus eugeniae*), as quais foram submetidas a testes de toxicidade para determinar a espécie mais apta a remediação, os ensaios estão descritos no item 3.4. Após, foi selecionado o anelídeo com melhor desempenho.

O próximo passo foi o ensaio de vermirremediação que está descrito no item 3.5. A concentração do biodiesel foi definida a partir dos testes de toxicidade. Na vermirremediação, foi analisada a capacidade dos anelídeos em remediar o solo com e sem o auxílio de bioestimulação (0,5% de esterco bovino por semana) e da microbiota do solo.

Nos tempos de 0, 7, 30, 60 e 90 dias da vermirremediação foram realizadas análises quantitativas da degradação e análise cromatográfica do perfil dos metil ésteres através de cromatografia gasosa. Além disso, foi realizado uma análise da população dos anelídeos semanalmente durante todo o processo, com o objetivo de determinar a toxicidade da remediação para os anelídeos.

O planejamento experimental encontra-se no Quadro 2, considerando os ensaios de letalidade, fuga, vermirremediação, análise de óleos e graxas, e cromatografia.

Quadro 2: Número de ensaios e de anelídeos a serem utilizados

ENSAIOS		Número de ensaios	Anelídeos/ensaio
Caracterização física do solo		1	
Caracterização química do solo		1	
Caracterização microbiológica		1	
Letalidade		30	10
Fuga		40	10
Vermirremediação		24	10
Cromatografia Gasosa		32	
Óleos e graxas		96	
Total Anelídeos			940

### 3.1 Minhocário

Utilizando uma mistura de turfa e esterco foi montado um minhocário, seguindo as indicações da NBR 15537 (2013) e da OECD (1984). Como a população de anelídeos necessárias para o experimento é de 940 anelídeos, foram criados 2 minhocários, cada um com capacidade de 600 anelídeos, com uma altura de 20 cm cada e uma área superficial de no mínimo 0,15 m<sup>2</sup>. Considerando a alimentação, a mesma foi composta de esterco de ovelha e turfa, as quais compõem o substrato do minhocário. Os minhocários podem ser vistos na Figura 11.

Figura 11:Minhocários



#### 3.1.1 Preparação dos compostos

Foi realizado a preparação do composto que serviria como base para a sobrevivência dos anelídeos. Foram coletados dois tipos de esterco, o bovino e o ovino. O esterco ovino foi utilizado devido a sua disponibilidade de fácil acesso para coleta, o mesmo foi coletado das

ovelhas de corte da CEPAGRO da UPF. O esterco ovino foi destinado para a realização da mistura com turfa, que funcionou como base do composto para manter o criatório de minhocas.

O esterco bovino foi coletado em campo com o objetivo de ter um maior controle de suas propriedades físicas e químicas, devido a este controle, o mesmo foi destinado para os ensaios de remediação como bioestimulante.

Ambos os esterco foram curados por períodos de duas semanas, destinados em montes de no máximo 10 cm de altura e revirados diariamente para a aeração. Com o objetivo de uma compostagem mais eficiente, os compostos foram mantidos úmidos durante o processo. Após este período, o esterco bovino foi triturado em um material fino para uma maior homogeneização e facilidade de pesagem para pequenas quantidades.

No final, foi realizada a determinação do pH dos compostos. As leituras de pH foram realizadas através do phmetro por diluição de 5g de composto em 50 ml de água deionizada. As leituras encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: pH dos substratos.

<b>Período</b>	<b>Tipo</b>	<b>pH</b>
17/03/18 - 05/04/18	Bovino	8,20
18/04/18 – 02/05/18	Ovino	6,88
09/05/2018 – 24/05/2018	Ovino	7,18

### 3.1.2 Preparação dos criatórios

Os criatórios foram preparados conforme recomendação da NBR 15537 (2013) e OECD (1984), uma mistura de 10 kg composta de uma proporção de 50:50 de esterco ovino e turfa foi adicionada a recipientes de dimensões 30x50x20 cm, suficiente para comportar 600 anelídeos da espécie *Eisenia andrei* e outra caixa para a *Eudrilus eugeniae*. A leitura do Ph da mistura foi realizada e o ph foi corrigido com calcário, até o mesmo ficar entre uma faixa de 6 a 7.

Inicialmente duas caixas foram preparadas, uma para portar a espécie *Eisenia andrei*, outra para a *Eudrilus eugeniae*.

Os anelídeos segundo a ISO 11268-1 (2012) e ABNT (2014) devem permanecer em um substrato com sua capacidade máxima de retenção de água entre 40 a 60%. Testes conforme ISO 11268-1 (2012) foram realizados para determinar a capacidade máxima de retenção, conforme explicado no item 3.2.1. Os substratos para os minhocários apresentaram uma capacidade máxima de retenção de 119% com um coeficiente de variação de 7,47%.

Para os minhocários foram adquiridos exemplares de matrizes de minhocas da empresa MINHOBOX, os exemplares apresentavam características de idade semelhante (diferença de menos de 2 semanas) e recém-chegados a maturidade. Tais matrizes foram adicionadas as misturas dos substratos.

### 3.2 Solo

Os ensaios de toxicologia e remediação foram realizados com solo do campo experimental de geotecnia da Universidade de Passo Fundo, o qual tem características de solo residual, proveniente de rochas basálticas, sendo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico úmico (STRECK et al.; VIEIRA, KLEIN, 2007)

A coleta foi realizada em trincheiras abertas no campo geotécnico da Universidade de Passo Fundo, à um metro de profundidade. Amostras do solo foram encaminhadas ao Laboratório de Solos e Microbiologia do Solo da UPF, para as análises química. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Engenharia Ambiental da UPF.

#### 3.2.1 Análise física, química e microbiológica do solo

Os ensaios de caracterização física têm por objetivo a obtenção de dados para a classificação do solo no Sistema Unificado de Classificação do Solo (SUCS) e para o Highway Research Board (HRB). Os ensaios são os seguintes:

- a) Ensaio de Granulometria conforme a NBR 7181 (ABNT, 2016)
- b) Limite de consistência, determinado pelo Limite de liquidez conforme NBR 6459 (ABNT, 2016), Limite e Índice de Plasticidade regido pela NBR 7180 (ABNT, 2016)
- c) Massa específica, descrito pela NBR 6508 (ABNT, 2016)
- d) Umidade (relação peso úmido, seco)
- e) Índice físicos (porosidade, índices de vazios, massa específica, grau de saturação)

Quanto a análise química, seguindo Tedesco et al (2005), busca-se os dados referentes as características e índices de concentração de nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio, alumínio, enxofre, boro, manganês, zinco, cobre, pH, Capacidade de Troca de Cátions (CTC),

porcentagem de matéria orgânica (MO), Hidrogênio + Alumínio (Acidez Potencial) e Saturação de Bases.

A análise microbiológica quantitativa de bactérias e fungos do solo foi determinada através de contagem de placas, pela diluição de amostras do solo em água deionizada de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  g/mL de solo, foi retirado amostras de 10g no período inicial ao da remediação, sendo realizado triplicatas.

Esta análise tem como objetivo levantar a biomassa presente no solo, requerida para os ensaios de toxicidade quando utiliza-se o solo natural, a caracterização serve também para levantar a fauna microbiana inicial do solo, antes dos processos de biorremediação.

Além disso, realizado o ensaio de capacidade máxima de retenção de água em triplicata, com objetivo de saber a umidade ideal do solo para as minhocas (40 a 60% da capacidade máxima de retenção). O ensaio consiste em deixar o solo submerso em água por um período de 3 h, após o período, retirar o solo e deixar em repouso por 2 h sobre areia molhada para que o excesso de água escorra conforme Figura 12.

Após as 2 horas o solo é pesado e seco em estufa por no mínimo 24 h, sendo no final do período retirado para pesagem novamente. A capacidade máxima de retenção é dada pela Equação 4.

Figura 12: Ensaio de capacidade máxima de retenção



$$CR = \frac{P_w - P_s}{P_s} \quad (4)$$

Onde  $CR$  é a capacidade máxima de retenção,  $P_w$  o peso úmido e  $P_s$  o peso seco.

### 3.3 Preparação do solo

O solo coletado foi espalhado em recipientes a temperatura ambiente até que alcançassem umidade 30%. Posteriormente, foi acrescentado contaminante (4% da massa do solo seco), retornando ao valor de 34%, referente a umidade natural de campo (REGINATTO, 2012).

A contaminação de 4% é justificada pelo fato de ser o índice máximo de contaminante oleoso que o solo estudado consegue reter (MENEGHETTI, 2005). A contaminação foi feita através dos seguintes passos:

Primeiramente, após a redução do teor de umidade, foi pesado o solo parcialmente seco, aplicando-se então a correção de umidade até os 30%, realizando-se a homogeneização do material.

Após, foi aplicado 4% de contaminante e realizado a homogeneização. No caso das amostras para os testes de toxicidade, para os valores de 1%, 2% e 3% de contaminação, foi adequado o valor de umidade do solo para que o valor final também alcançasse os 34% referente a umidade natural do solo em questão. Em relação a concentração a ser definida para o ensaio de vermicoremediação, após a análise da toxicologia para determinar a concentração, o procedimento seguido foi o mesmo.

### 3.4 Ensaios de toxicidade

Dois ensaios de toxicidade foram realizados: ensaio de letalidade e ensaio de fuga, com o objetivo de determinar o anelídeo com melhor capacidade de sobrevivência, e em conjunto, determinar uma concentração de contaminação adequada para o experimento de remediação.

#### 3.4.1 Ensaio de letalidade

Amostras de solo com 500g ou 750 g foram utilizadas para o ensaio com concentrações de 0%, 1%, 2%, 3% e 4% de biodiesel em solo, sendo cada concentração feita em triplicata. Duas espécies (*Eisenia andrei* e *Eudrilus eugeniae*) foram submetidas ao ensaio. A contagem das minhocas vivas foi realizada no tempo inicial e aos 7 e 14 dias, totalizando 30 ensaios (cinco concentrações, triplicata, e duas espécies).

O número de anelídeos por amostra foi de 10 unidades, sem alimentação no período do ensaio (14 dias). Este ensaio é descrito pela OECD (1984) e NBR 15537 (ABNT, 2014). O solo utilizado foi o latossolo de Passo Fundo.

Os anelídeos foram lavados rapidamente antes do uso, pesados, e depositados nos recipientes, os quais foram cobertos por uma película de plástico perfurado.

A temperatura do ensaio foi de 20°C com variação máxima de mais ou menos 2°C. O ensaio foi realizado utilizando turnos de luminosidade de 16/8 h conforme mostrado na Figura 13. A mortalidade é medida esvaziando o teste em uma superfície e vendo a reação do anelídeo a um estímulo mecânico da parte frontal (toque na região da cabeça).

Figura 13: Ambiente do ensaio.



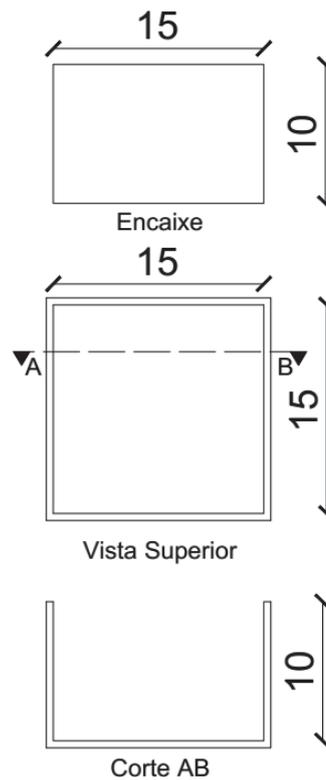
#### 3.4.2 Ensaio de fuga

O ensaio de fuga tem como objetivo avaliar o comportamento dos anelídeos na presença do contaminante. A metodologia é regida pela NBR 17512 (ABNT, 2011). A normativa relata dois tipos de recipientes para a realização do ensaio (câmara de duas e câmara de seis secções). Foi utilizado a câmara de duas secções.

O recipiente está descrito na Figura 14, metade do recipiente é preenchido com solo controle, metade com solo contaminado. Os anelídeos (10 unidades adultas) são colocados no centro do recipiente conforme demonstrado na Figura 15. Após a colocação dos mesmos, eles terão liberdade de escolher entre o solo contaminado e o solo controle.

O solo para o ensaio foi peneirado em uma peneira de 2 mm e ajustado para uma capacidade de 50% da capacidade máxima de retenção de água (30% de umidade). O solo é colocado sem nenhuma compactação, portando com sua densidade natural após o peneiramento.

Figura 14: Câmera de 2 secções (valores em cm).



Fonte: Elaborado pelo autor baseado em NBR ISSO 17512-1 (2011)

O ensaio é composto por um recipiente e um encaixe, o encaixe é utilizado para dividir as secções do solo no final do ensaio para a realização da contagem, conforme mostrado na Figura 15.

Figura 15: Procedimento do ensaio de fuga.



A norma recomenda aço inoxidável ou outro material inerte para o recipiente em solos com contaminação orgânica, foi utilizado recipientes de vidro vedados com silicone. Os anelídeos puderam passar livremente por entre as localidades e não foi permitida a entrada de luz pelas paredes do recipiente. Somado a isto, medidas para impedir a fuga foram realizadas, um plástico foi usado como vedação de tampa, sendo este furado para permitir a entrada de oxigênio. A altura do solo ficou entre 5 a 6 cm conforme recomendação da norma. Para os testes de fuga com a *Eisenia andrei* foi utilizado 500 g de solo seco por recipiente, e concentrações de 0%,1%,2%, 3% e 4% de biodiesel. Já para a *Eudrilus eugeniae* foi usado 750g de solo seco e contaminações de 0%, 0,5% 1%, 2% e 3%.

No final do ensaio, os divisores foram deslizados junto às paredes dos compartimentos, servindo para isolar as secções. Outras variáveis fixas do ensaio foram: temperatura de 20°C com variação máxima de 2°C, e o fator de iluminação, fixado entre 400 e 800 lux com intervalos de ciclo claro/escuro de 16/8h.

O ensaio teve como objetivo detectar efeitos sub-letais, permitindo no máximo para validação do teste a morte de um indivíduo por amostra, o ensaio tem duração de 48 horas. Quintuplicatas foram realizadas para a espécie *Eisenia andrei* e triplicatas para a *Eudrilus eugeniae*. Na análise de quantificação do número de anelídeos por secção no final do ensaio, caso a anelídeo esteja partido devido a divisória, é contabilizado 0,5 para cada seção, independente da proporção em cada um dos lados.

### **3.5 Preparação da amostra para vermirremediação**

Aquários de 15 x 15 x 10 cm de altura foram utilizados para a colocação do solo contaminado e os anelídeos. O solo foi contaminado com uma concentração de biodiesel determinada a partir dos resultados dos testes de toxicidade (30g/kg), a maior concentração testada que ficou abaixo a faixa da faixa de 50% de letalidade. Porém durante a contaminação dos recipientes de vermirremediação, somente 24g/kg permaneceram no solo dos 30g/kg utilizados, provavelmente devido a grande quantidade de solo utilizado e dificuldade de homogeneização. O número de anelídeos utilizados por recipiente foi de 10 unidade para cada 1 kg de solo contaminado, valor mais comum utilizado pela bibliografia. O experimento teve as seguintes variáveis, microrganismos presente no solo natural, bioestimulação (5g/kg de esterco

bovino) e a presença dos anelídeos conforme Quadro 3, com triplicata, totalizando 24 experimentos no total. As demais variáveis permaneceram fixas, sendo estas a temperatura e a umidade do solo de 30%. Os solos sem a presença de microrganismos serão esterilizados em autoclave, com o objetivo de eliminar os microrganismos presentes naturalmente no solo.

Quadro 3: Delineamento dos ensaios de biorremediação.

Ensaio	Microrganismos	Alimento	Anelídeos
MBA	X	X	X
MB	X	X	
M	X		
MA	X		X
BA		X	X
A			X
B		X	
CONTROLE			

### 3.6 Determinação da biodegradação

As amostras para os ensaios de determinação da degradação foram retiradas do solo após o revolvimento semanal do solo.

Análises de degradação foram realizadas em intervalos de 7, 30, 60 e 90 dias para cada um dos ensaios. A degradação quantitativa foi realizada através da extração do biodiesel por óleos e graxas.

A metodologia adotada para a extração é descrita em USEPA 3550B (1996), a determinação do teor residual, e conseqüentemente, a porcentagem de degradação encontram-se nas Equações (4) e (5).

Para a extração, primeiramente é diluído 10g de amostra de solo em 50 ml de hexano. A amostra diluída é levada ao ultrassom, aonde através da agitação das particuladas o biodiesel desprende-se do solo e dilui-se no hexano. Após o período de 2 minutos de agitação no ultrassom, o líquido hexano+biodiesel é filtrado para remover as partículas do solo. Este processo é repetido para a mesma amostra de solo, totalizando no final uma amostra de 100 ml de hexano + biodiesel. No final, os 100 ml da amostra são aquecidos a 80° C para remover o hexano do meio, deixando somente o biodiesel retirado da amostra de solo, com o qual determina-se a concentração do contaminante no solo.

$$Tr = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \quad (4)$$

Sendo:  $Tr$  o teor residual,  $P_0$  o peso seco da amostra utilizada em gramas,  $P_1$  o peso do béquer em gramas,  $P_2$  o somatório do peso do béquer e a amostra extraída do solo contaminado ambas em gramas.

$$D = \frac{V_i - V_f}{V_i} \quad (5)$$

Onde:  $D$  é a degradação,  $V_i$  o valor inicial do biodiesel adicionado ao solo em porcentagem,  $V_f$  o valor final extraído em cada tempo de análise (%).

A cromatografia foi utilizada para a avaliação da degradação das cadeias carbônicas do biodiesel. O Cromatógrafo Gasoso utilizado foi da Marca Varian, modelo STAR 3400cx, com colunas PE-WAX (Polietilenoglicol), as quais iniciaram a uma temperatura de 35°C durante 5 minutos, após foi acrescido 5°C a cada min até atingir uma temperatura de 245°C aos 20 minutos, a temperatura do injetor é de 250°C e do detector 300°C, a injeção foi do tipo Split 1:50, sendo a fase móvel composta de hidrogênio UP com um fluxo de 1,0 mL/min e um volume injetado de 0,5µL.

A identificação das cadeias de carbonos foi através de uma mistura comercial de carbonos (padrão) do C15 ao C30, analisando-se a concentração desses compostos em diferentes tempos da amostragem, se calculara a eficiência da remoção, a partir da equação (5)

$$D = \frac{C_i - C_f}{C_i} \quad (5)$$

No qual:  $D$  é a degradação,  $C_i$  é valor inicial da área do carbono analisado,  $C_f$  o valor final da área do carbono em cada intervalo de tempo na análise.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados das análises de toxicidade e de remediação realizadas com o biodiesel. Bem como a caracterização do solo e do biodiesel utilizado.

### 4.1 Características Físico, químico e microbiológica do solo

As características físico-químicas encontram-se na Tabela 4, os valores foram levantados através das análises realizadas pelo Laboratório de solos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

O pH natural do solo (5,1) é considerado ácido e fica fora da faixa ideal para a proliferação de microrganismos, tendendo a diminuir também a capacidade de degradação. Porém, o solo apresenta boa porosidade, permitindo uma boa passagem de oxigênio para a respiração dos microrganismos.

De forma complementar, uma análise da capacidade máxima de água foi realizada segundo recomendações da ABNT (2013), pois os ensaios de toxicologia necessitam que o solo seja ajustado de 40 a 60% da capacidade máxima de retenção de água. A análise foi feita em triplicata, a capacidade máxima de retenção do solo é de 59,75% com um coeficiente de variação de 2,70%, portanto, os ensaios foram ajustados para uma umidade do solo de 30%, correspondente a 50% da capacidade máxima de retenção.

Também realizou-se a caracterização química do composto utilizado nos ensaios de vermirremediação como fonte de bioestimulação e alimentação (esterco bovino), os resultados encontram-se na Tabela 5.

Conforme Tabela 5, o composto apresenta boa carga de nutrientes para servir como fomentador dos microrganismos, e ao mesmo tempo é uma boa alimentação para os anelídeos presentes na amostra. O esterco é rico em nitrogênio com uma relação de carbono nitrogênio de 8,98/1.

Tabela 4: Caracterização do solo.

PARAMÊTRO	VALOR
Argila (%)	72
Silte (%)	15
Areia (%)	13
Limite de Liquidez (%)	53
Limite de Plasticidade (%)	42
Peso Específico das Partículas (kN/m <sup>3</sup> )	26,7
Índice de Vazios	1,19
Peso Específico Natural (kN/m <sup>3</sup> )	16,3
Grau de Saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
pH	5,1
Matéria Orgânica (%)	0,9
Condutividade Hidráulica (cm/s)	1,39x10 <sup>-3</sup>
Fósforo (mg/dm <sup>3</sup> )	6
Potássio (mg/dm <sup>3</sup> )	29
Alumínio (cmolc/dm <sup>3</sup> )	2
Cálcio (cmolc/dm <sup>3</sup> )	4
Magnésio (cmolc/dm <sup>3</sup> )	1,3
H+Al (cmolc/dm <sup>3</sup> )	9,7
CTC (cmolc/dm <sup>3</sup> )	15,1
Saturação de Bases (%)	36
Saturação de Alumínio (%)	27
Saturação de Potássio (%)	0,5
Ind. SMP	5,3
Enxofre (mg/dm <sup>3</sup> )	>62
Boro (mg/dm <sup>3</sup> )	0,4
Manganês (mg/dm <sup>3</sup> )	17,2
Zinco (mg/dm <sup>3</sup> )	1,84
Cobre (mg/dm <sup>3</sup> )	1,77

Tabela 5: Caracterização química do esterco bovino

Parâmetro	Valor
Umidade 65°C (%)	16,70
Nitrogênio (%)	2,33
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	1,80
K <sub>2</sub> O (%)	3,33
Carbono orgânico (%)	20,92
CTC (mmol <sub>c</sub> /kg)	429,00
Cálcio (%)	2,66
Magnésio (%)	0,62
Enxofre (%)	0,57
Zinco (mg/kg)	201,34
Cobre (mg/kg)	66,59
Manganês (mg/kg)	679,50
Boro (mg/kg)	388,29

A caracterização microbiológica do solo foi realizada por meio da contagem das bactérias aeróbias e dos fungos presentes no solo. O solo apresenta uma média de 5,36 UFC/mL de bactérias com um coeficiente de variação de 2,70% e uma média de 4,58 UFC/mL de fungos com um coeficiente de variação de 10,44%.

#### 4.2 Biodiesel

O biodiesel utilizado na pesquisa tem sua origem de soja puro (B100), produzido pela empresa BSBIOS, localizada na BR 285, km 294, no distrito industrial de Passo Fundo, tal biodiesel tem em sua composição as características apresentadas na Quadro 4 conforme laboratório da BSBIOS.

Os valores apresentam-se dentro das faixas de caracterização para o biodiesel a base de soja citadas no item 2.5 da revisão, a caracterização somente apresenta um índice de cetanos menor (43) que os citados na bibliografia (45, 51, 51).

Uma análise cromatográfica do biodiesel foi realizada, o resultado é apresentado na Tabela 6.

Quadro 4: Relatório das características e especificações do biodiesel

Ensaio	Resultado	Unidade	Especificação	Norma de Referência
Aspecto 28,5 °C	LII	-	Límpido de isento de impurezas	MA-CQ-018/07
Massa Específica a 20 °C	880,1	kg/m <sup>3</sup>	850 - 900	ASTM D 4052/2016
Viscosidade Cinemática a 40 °C	4,309	mm <sup>3</sup> /s	3,0 - 6,0	ASTM D 445/2017a
Teor de água	170	mg/kg	Máximo 200	ASTM D 6304/2016
Contaminação Total	15,8	mg/kg	Máximo 24	EN 12662/2008
Ponto de Fulgor	142,5	°C	Mínimo 100,0	ASTM D 93/2006a
Teor de Éster	99,3	% massa	Mínimo 96,5	EN 14103/2011
Cinzas Sulfatadas	<0,005	% massa	Máximo 0,02	ASTM D 874/2013a
Enxofre Total	2,6	mg/kg	Máximo 10	ASTM D 5453/2016
Sódio + Potássio	1,1	mg/kg	Máximo 5	NBR 15553/2015
Cálcio + Magnésio	<1,0	mg/kg	Máximo 5	NBR 15553/2015
Fósforo	<1,0	mg/kg	Máximo 10	NBR 15553/2015
Corrosividade ao Cobre, 3h a 50 °C	1a	-	Máximo 1	ASTM D 130/2012
Ponto de Entupimento de Filtro a Frio	1	°C	Máximo 4	ASTM D 6371/2017a
Índice de Acidez	0,42	mg/g	Máximo 0,50	EN 14104/2003
Glicerina Livre	0,018	% massa	Máximo 0,02	ASTM D 6584/2017
Glicerina Total	0,186	% massa	Máximo 0,25	ASTM D 6584/2017
Monoglicerídeos	0,601	% massa	Máximo 0,70	ASTM D 6584/2017
Diglicerídeos	<0,092	% massa	Máximo 0,20	ASTM D 6584/2017
Triglicerídeos	0,001	% massa	Máximo 0,20	ASTM D 6584/2017
Índice de Iodo	117	g/100 g	Anotar	EN 14111/2003
Estabilidade à Oxidação a 110 °C	11,8	Horas	Mínimo 8	EN 14112/2016
Número de Cetano	43,1	-	Anotar	ASTM D 6890/2016

Fonte: Autoria própria

Tabela 6: Cromatografia do biodiesel analisado

Ácido graxo	Área %
C16:0	14,16
C18:0	6,25
C18:1	29,14
C18:2	43,82
C18:3	6,63

Os resultados da cromatografia apresentam alguns picos de ésteres em comum com o biodiesel de soja puro mostrado no item 2.5 da revisão bibliográfica, porém, enquanto o maior pico do biodiesel caracterizado é do C18:2 (metil linoleato), o pico no biodiesel de soja puro segundo literatura é C18:1 (metil oleato), sendo o C18:2 o 4º pico em área somente. Essa diferença pode ser pela procedência da soja, método produtivo ou por ele não ser composto somente de soja pura e ter outras substâncias em sua composição como gordura de frango, suína, e bovina.

### 4.3 Ensaios de toxicologia.

Os resultados dos ensaios de toxicologia apresentam-se nos itens 3.4.1 e 3.4.2. Os ensaios de toxicologia demonstram que a espécie com maior tolerância ao contaminante é a *Eudrilus eugeniae*, a qual sobrevive a concentrações de até 30g/kg de biodiesel e evita o solo contaminado em concentrações superiores a 20g/kg. A espécie *Eisenia andrei* resistiu a concentrações de até 20g/kg de biodiesel e evitou o solo contaminado para concentrações superiores a 10g/kg de biodiesel. Com base nos resultados de toxicologia a espécie *Eudrilus eugeniae* foi a selecionada para os ensaios de remediação.

#### 4.3.1 Ensaio de fuga

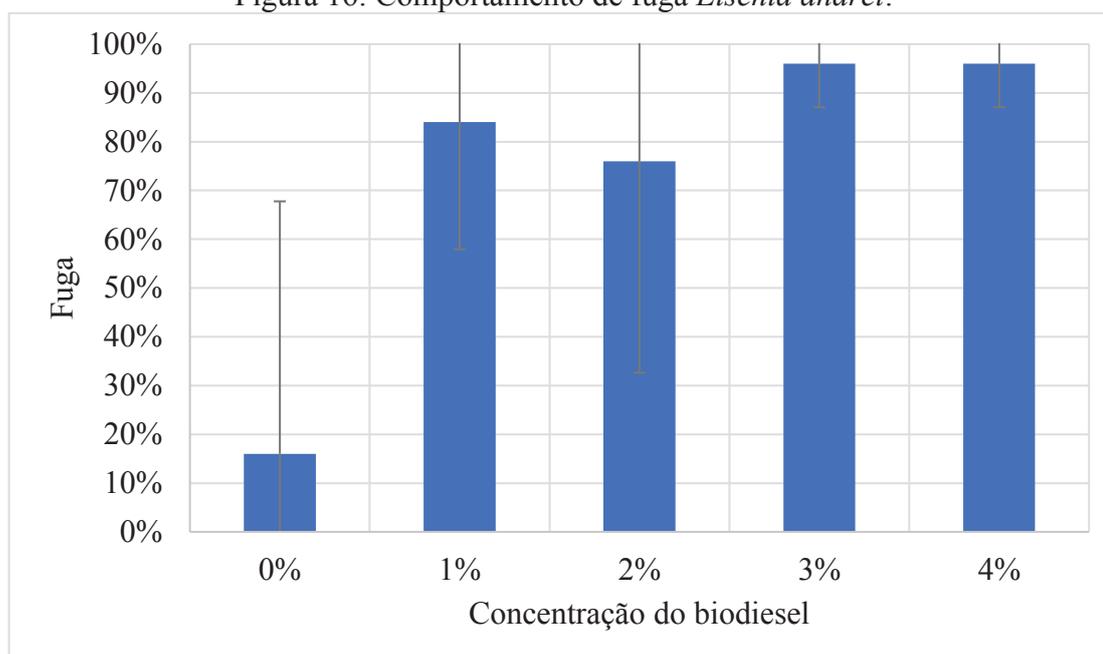
O ensaio foi realizado conforme item 3.4.2 da metodologia. Para a espécie *Eisenia andrei* foram selecionados anelídeos com a faixa de massa entre 300 a 600 mg, com 10 unidades em cada recipiente, em quintuplicata (A, B, C, D, E). A massa unitária média dos anelídeos no ensaio foi de 0,487 g com um coeficiente de variação de 4,95%. Os resultados da análise de fuga para a espécie apresentam-se na Tabela 7.

Tabela 7: Taxa de fuga para a *Eisenia andrei*.

CONCENTRAÇÃO	A		B		C		D		E		MÉDIA		TOTAL		FUGA(%)
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	
CONTROLE	9	1	8	2	6	4	5	2	7	3	7	2,4	35	12	52%
1%	9	0	10	0	9	1	10	0	7	3	9	0,8	45	4	84%
2%	5	5	8	1	10	0	10	0	10	0	8,6	1,2	43	6	76%
3%	10	0	9	1	10	0	10	0	10	0	9,8	0,2	49	1	96%
4%	10	0	10	0	9	0	9	0	9	1	9,4	0,2	47	1	96%

Onde N é o solo natural e C é o solo contaminado.

Nota-se que no geral, independente da contaminação, que o comportamento das minhocas da espécie *Eisenia andrei* é de evitar o local em que há o contaminante, preferindo a área de solo natural. Na Figura 16 se encontra o gráfico de tendência de fuga.

Figura 16: Comportamento de fuga *Eisenia andrei*.

Para a *Eudrilus eugineae* algumas modificações foram realizadas, primeiramente a faixa de massa foi entre 1000 a 2000 mg devido ao porte do anelídeo. Também foram adotadas menores concentrações de contaminação, utilizando-se de 0,5%, 1%, 2% e 3% de biodiesel em solo. O ensaio foi realizado em triplicata (A, B, C), com 10 unidades por caixa, o peso médio foi de 1,77 g (coeficiente de variação de 0,78%). Os resultados da análise de fuga apresentam-se na Tabela 8.

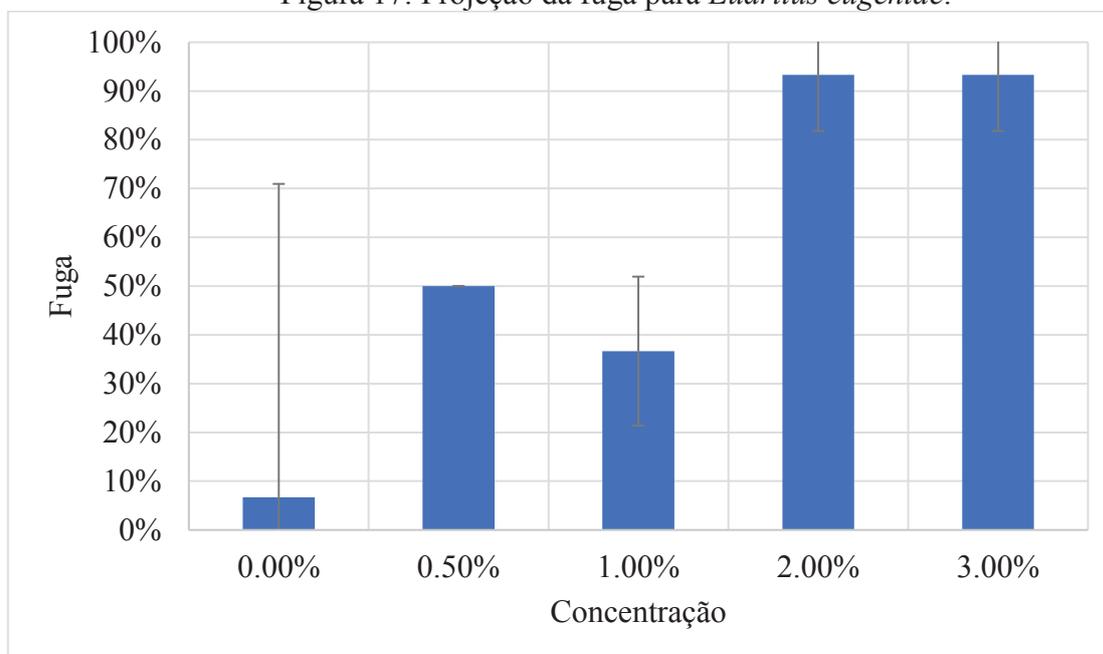
Tabela 8: Taxa de fuga para a *Eudrilus eugeniae*

CONCENTRAÇÃO	A		B		C		MÉDIA		TOTAL		FUGA(%)	Ph solo
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C		
CONTROLE	6	4	7	3	1	9	2,8	3,2	14	16	-7%	5,1
0,5%	7,5	2,5	7,5	2,5	7,5	2,5	4,5	1,5	22,5	7,5	50%	4,73
1%	6	4	7	3	7,5	2,5	4,1	1,9	20,5	9,5	37%	4,6
2%	10	0	9	1	10	0	5,8	0,2	29	1	93%	4,6
3%	9	1	10	0	10	0	5,8	0,2	29	1	93%	4,64

Conforme Tabela 8, o biodiesel tem uma influência no pH do meio, tornando-o um pouco mais ácido, fazendo com que o ambiente seja menos amigável aos anelídeos, os quais preferem um pH mais próximo ao neutro. Até uma concentração de 1%, as minhocas da espécie *eugeniae* evitam parcialmente o solo, e em concentrações maiores que 1%, elas tendem a fugir do solo contaminado.

Os resultados mostram que a uma concentração de 10g/kg de biodiesel, até 50% das minhocas da espécie *eugineae* tendem a evitar a contaminação de biodiesel. Para concentrações acima de 20g/kg de biodiesel, o valor de fuga fica próximo a 100%. O gráfico de fuga pode ser visto Figura 17.

Figura 17: Projeção da fuga para *Eudrilus eugeniae*.



Foi realizado também a análise de aleatoriedade, sendo que os lados (esquerdo ou direito) em qual o solo contaminado foi colocado foram dispostos de maneira aleatória, de forma a evitar possíveis preferências devido a influências externas a um dos lados (iluminação, temperatura). A Tabela 9 demonstra que a tendência das minhocas em definir um lado que não sofreu influências externas do meio.

Tabela 9: Aleatoriedade dos lados

CONTROLE	A		B		C		MÉDIA		TOTAL		FUGA (%)	Ph solo	Conductiv.
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D			
	6	4	7	3	1	9	2,8	3,2	14	16			
1%	7,5	2,5	5	5	2,5	7,5	3	3	15	15	0%	4,73	12,27
1%	6	4	3	7	7,5	2,5	3,3	2,7	16,5	13,5	10%	4,6	12,27
2%	0	10	9	1	10	0	3,8	2,2	19	11	27%	4,6	12,27
3%	9	1	0	10	10	0	3,8	2,2	19	11	27%	4,64	12,27

Na literatura não existe análise de fuga com biodiesel. Cuevas-Díaz et al (2017) analisaram a fuga da espécie *Pontoscolex corethrurus* em óleo pesado bruto, sendo que a

mesma apresentou fuga de 52, 39, 42, 60, 95 e 100% para as concentrações de 0, 0,0551, 0,0969%, 0,4845%, 0,9991% e 1,4869%. Hentati et al (2012) analisando a fuga da espécie *Eisenia andrei* para diferentes concentrações de petróleo, obteve uma taxa de fuga de 90, 100, 85, 77 e 100% para concentrações de 5,05%, 11,60%, 16,15%, 0%, 11,63% para diferentes tipos de solo. Mooney et al (2012) obteve índices de fuga de 80%, 50% e 68% para concentrações de diesel de 0,2, 0,3 e 0,6% para a espécie *Microscolex macquariensis*. Shaefer (2005) analisou a fuga na espécie *Eisenia fetida* para concentrações de TPH de 0,2, 0,316 e 1,074% e obteve índice de fugas de 73, 73 e 84%. Os resultados demonstram que os anelídeos apresentam-se mais tolerantes a presença do biodiesel do que TPH e diesel. Em relação ao óleo pesado bruto, a espécie *Eisenia andrei* apresentou comportamento similar para o biodiesel, porém vale resaltar com apresentado por Mooney et al (2012) que o tipo de solo pode afetar o comportamento de fuga.

As duas espécies analisadas nesta dissertação apresentaram diferentes comportamentos de fuga para o biodiesel, a espécie *Eudrilus eugeniae* apresentou uma maior tolerância a presença do contaminante. Em contrapartida, Vashanta-Srinivasan (2018) comparou a toxicidade e fuga das espécies *Eisenia Fetida* e *Eudrilus eugeniae* em pesticidas, o autor notou que a mortalidade para as diferentes espécies varia pouco, apresentando na maioria dos casos a mesma faixa de mortalidade e tendência a evitar o solo contaminado para as devidas concentrações. Portanto a sensibilidade para diferentes espécies pode variar para outros contaminantes orgânicos que não sejam agrotóxicos, ou a espécie *Eisenia andrei* apresenta uma menor tolerância que a *Eisenia fetida*.

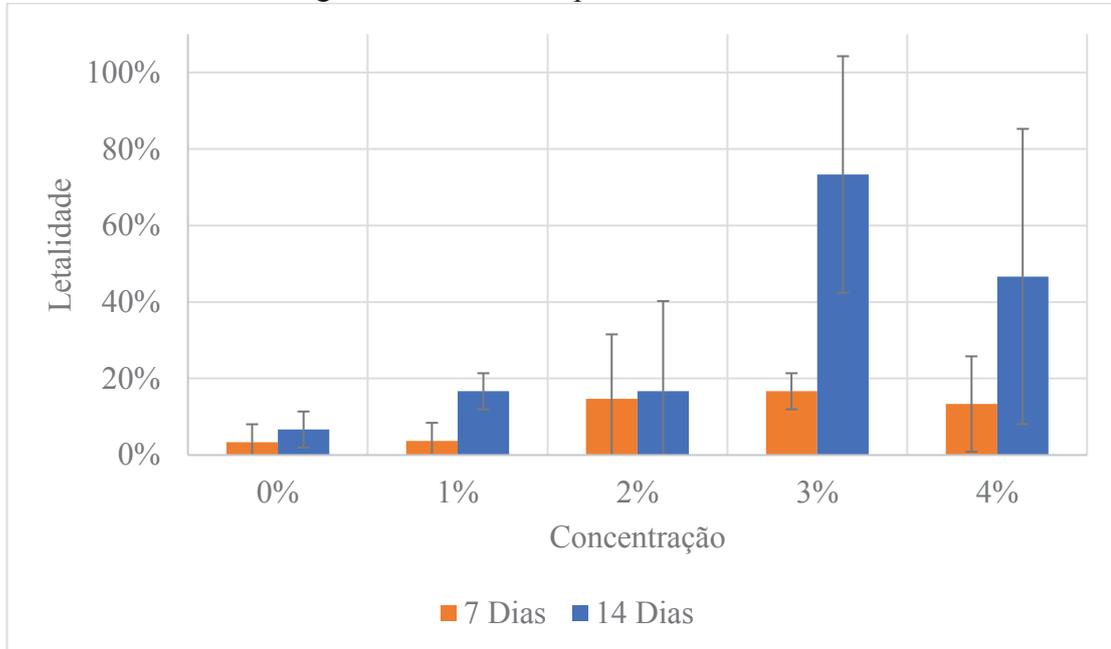
#### 4.3.2 Letalidade

Os anelídeos foram selecionados aleatoriamente considerando uma faixa de peso de 300 mg a 700 mg, com peso médio de 0,386 e coeficiente de variação de 3,77%.

Os resultados de letalidade apresentam-se na Figura 18, na primeira semana não ocorreu morte significativa dos anelídeos, porém os resultados já mostravam uma tendência de toxicidade com o aumento das concentrações. Já na segunda semana, o biodiesel se mostrou tóxico para concentrações de 3 e 4%, o controle apresentou uma faixa de 93% de sobrevivência, acima das 90% necessários para a validade do teste.

As concentrações de biodiesel de 3% e 4% apresentaram valores de letalidade acima dos 50%, sendo considerados letais para a espécie. Os índices de mortes aumentam drasticamente após os 2%, permanecendo baixo nas outras concentrações.

Figura 18: Letalidade para *Eisenia andrei*.



Em relação a espécie *Eudrilus eugeniae*, os anelídeos foram selecionados entre a faixa de peso de 1000 mg e 2000 mg, o peso médio foi de 1240 mg com um coeficiente de variação de 7,67%. Os resultados de letalidade apresentam-se na Figura 19, percebe que ocorreu mortalidade somente na segunda semana do ensaio, nas concentrações de 3 e 4%, porém a letalidade somente foi considerada tóxica para a concentração de 4%. Foi observado que a partir da concentração de 2% as minhocas tendiam a ficar reunidas em grupos (bolos), com o objetivo de se defender do ambiente agressivo.

Ainda, conforme Figura 20, nota-se que ocorreu ganho de peso nas minhocas durante os 14 dias de ensaio para as concentrações de 1% a qual obteve o maior ganho, seguido pelo controle e 2%. A concentração de 3% se manteve estável e a concentração com 4% ocorreu declínio de peso em conjunto com a letalidade.

Figura 19: Gráfico de letalidade para a *Eudrilus eugeniae*

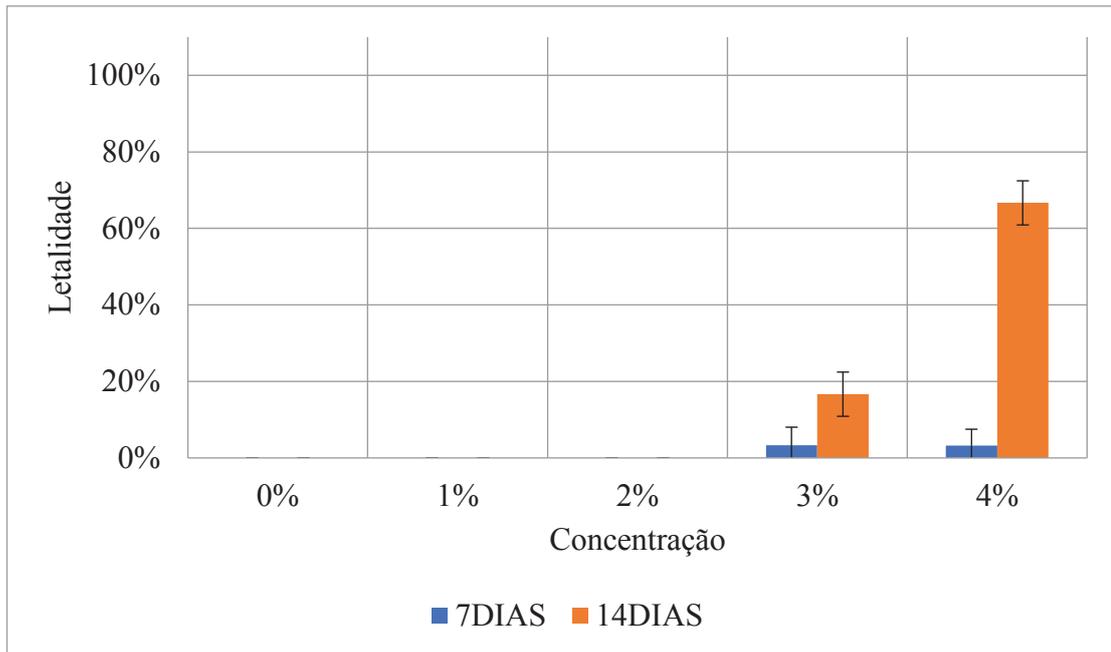
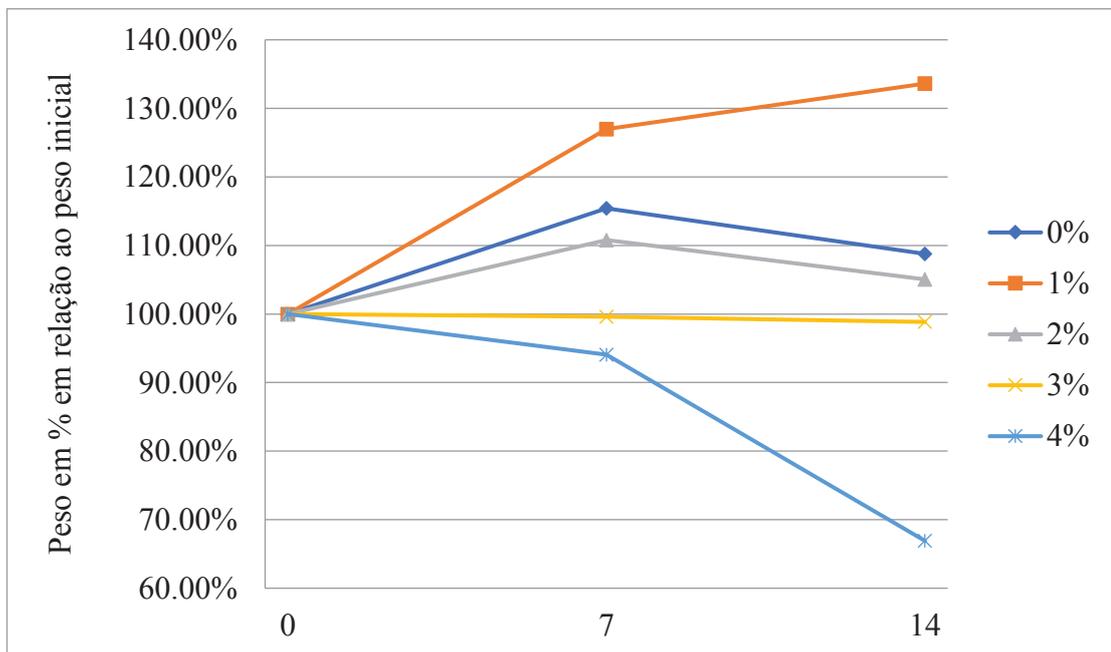


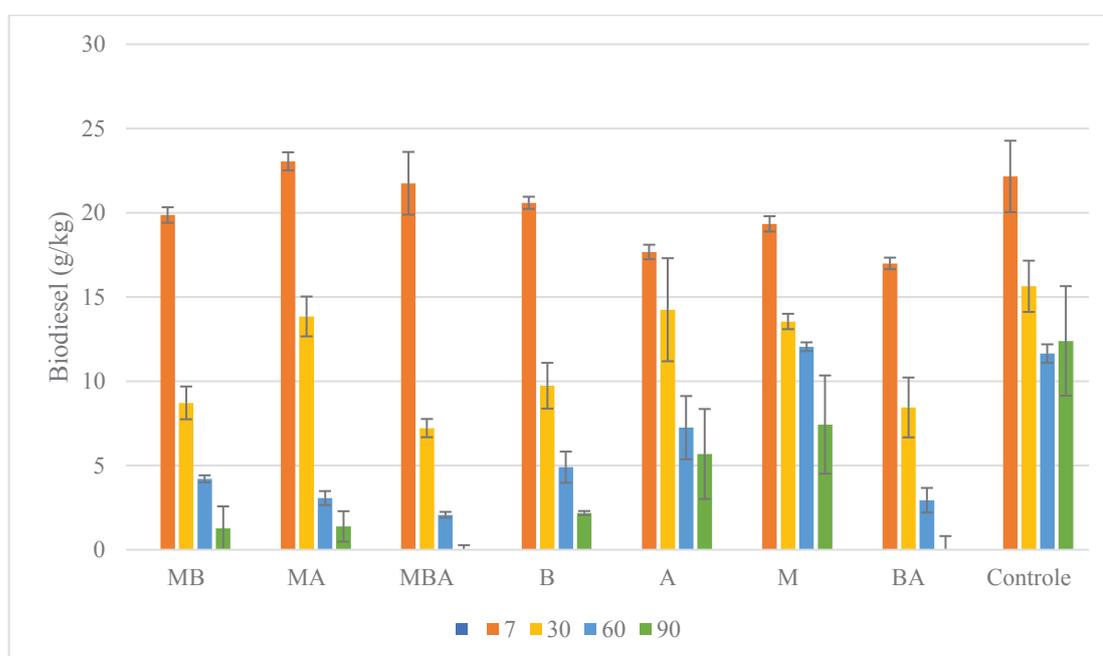
Figura 20: Controle de peso durante o ensaio de letalidade para *Eudrilus eugeniae*



#### 4.4 Degradação do Biodiesel

Foram realizadas análises de óleos e graxas para determinar as concentrações de biodiesel no solo aos 7, 30, 60 e 90 dias. Percebe-se, como demonstrado na Figura 21, que ocorreu degradação em todas as combinações, sendo as amostras “microrganismos e bioestimulação (MB)”, “microrganismos, bioestimulação e anelídeos (MBA)” e “bioestimulação e anelídeos (BA)” as mais eficientes. Alcançou-se 100% de degradação nas combinações “microrganismos, bioestimulação e anelídeos (MBA)” e “bioestimulação e anelídeos (BA)”. O maior período de degradação é no final do primeiro mês e no segundo mês. No último mês ocorre uma redução na velocidade de degradação, pois a quantidade disponível de biodiesel já é pequena.

Figura 21: Degradação do biodiesel no processo de remediação ao longo do tempo

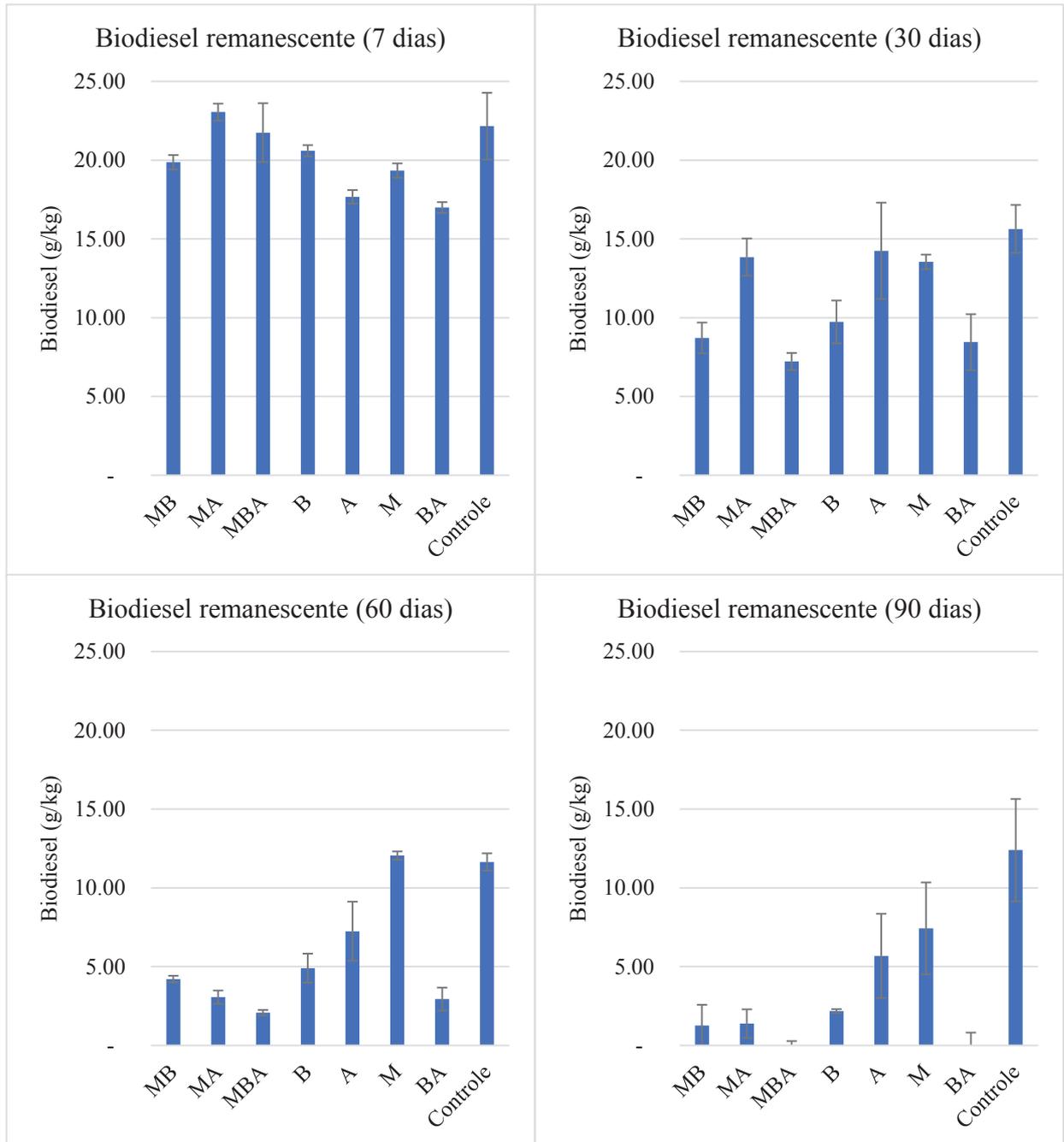


Onde M é microrganismos, B corresponde a bioestimulação e A é anelídeos.

Conforme a Figura 22, para a contaminação inicial de 24 g/kg, ocorreu alguma degradação até o período de 7 dias nas amostras referente a “anelídeos (A)” (26%) e “bioestimulação e anelídeos (BA)” (29%). Também ocorreu alguma degradação ou perda no controle, isso pode ser causado pelo revolvimento do solo feito periodicamente e pelo fato que as amostras ficam em contato direto com o ar, gerando uma contaminação de microrganismos presentes no ambiente. Se comparado ao controle no mesmo período, ocorreu uma degradação

de 20% (A) e 23% (BA). Nas outras amostras não ocorreu degradação relevante no período de 7 dias.

Figura 22: Degradação do biodiesel na remediação em diferentes periodos de tempo



Onde M é microrganismos, B corresponde a bioestimulação e A é anelídeos.

No final de 30 dias, a maior degradação ocorreu nas amostras a qual continham bioestimulação com esterco bovino (5g/kg/semana). A degradação foi 64% (MB), 70% (MBA), 59% (B) e 65% (BA). Nas amostras somente com anelídeos, ocorreu uma menor velocidade de degradação e uma alta mortalidade nas minhocas, fato causado pelo stress causado pela falta de alimentação e da esterilização do solo. Em relação ao solo controle no mesmo período a degradação foi de 44% (MB), 54% (MBA), 38% (B) e 46% (BA).

No período entre 30 e 60 dias, a degradação continuou em velocidade um pouco menor que o mês inicial, e a bioestimulação continua sendo o principal agente estimulador da degradação. Com a redução do biodiesel em relação ao período inicial, o stress perante os anelídeos reduziu, causando um aumento na velocidade de degradação nas amostras com anelídeos se comparado as outras amostras. As maiores degradações ocorreram na amostra “MBA” (91%), “BA” (88%), “MA” (87%) “MB” (82%) e “B” (80%). Em relação ao controle no mesmo período, a degradação foi de 82% (MBA), 75% (BA), 74% (MA) 64% (MB) e 58% (B).

Ocorreu um aumento na influência dos anelídeos no processo de remediação entre o período de 30 a 60 dias como notado na Tabela 10. Aumento gerado pela diminuição da concentração inicial de biodiesel e adaptação dos anelídeos ao solo contaminado. Esse acréscimo de degradação destaca-se em “microrganismos e anelídeos (MA)” onde ocorre um acréscimo de 45% na degradação, já na amostra somente com anelídeos, devido a alta letalidade ocorreu menor diferença.

Tabela 10: Influência dos anelídeos na degradação no 2 mês.

AMOSTRA	DEGRADAÇÃO			
	TEMPO		ACRESCIMO DE DEGRADAÇÃO (60-30)	DESVIO PADRÃO
	30	60		
Microrganismos e bioestimulação	64%	82%	19%	4,87%
Microrganismos e anelídeos	42%	87%	45%	3,30%
Micro. bioest. e Anel.	70%	91%	21%	2,13%
Bioestimulação	59%	80%	20%	2,74%
Anelídeos	41%	70%	29%	7,90%
Microrganismos	44%	50%	6%	2,87%
Bioestimulação e Anelídeos	65%	88%	23%	5,41%
Controle	35%	51%	17%	8,41%

No final do período de 90 dias, a degradação ocorreu em velocidade menor que nos períodos anteriores. As amostras “microrganismos, bioestimulação e anelídeos (MBA)” e

“bioestimulação e anelídeos (BA)” alcançaram uma degradação de 100%. “microrganismos e bioestimulação (MB)” e “microrganismos e anelídeos (MA)” alcançaram uma degradação de 95% e 94% respectivamente. Porém se considerar o desvio padrão, “Microrganismos e bioestimulação (MB)” também alcançou 100% de degradação.

Em relação ao controle no mesmo período, a degradação foi de 90% e 89% para “Microrganismos e bioestimulação (MB)” e “microrganismos e anelídeos (MA)” respectivamente. O controle degradou 48% em relação a sua concentração inicial.

O desvio padrão alto em algumas das amostras se dá pelo fato da quantidade de solo estudado por amostra (1kg), causando com que o processo de remediação não ocorra homogeneamente em toda a amostra, tendo pontos com maior e menor concentração de biodiesel. Conforme a metodologia foi retirado uma amostra de cada solo para cada uma das triplicatas. Uma das soluções para a redução da variabilidade na estatística é a realização da coleta de mais amostras por unidade de triplicata e a realização do quarteamento antes da retirada das mesmas.

#### 4.4.1 Curvas de degradação

As curvas de degradação demonstradas na Figura 23 e na Figura 24 foram geradas para as diferentes combinações das variáveis, as curvas seguiram tendência logarítmica. A maior degradação ocorreu nas primeiras semanas até o final do primeiro mês, seguido de uma redução na velocidade nos meses finais do levantamento. As amostras que sofreram bioestimulação apresentaram maior degradação nos meses iniciais, fato gerado pelo acréscimo de microrganismos e nutrientes no meio. No período de 30 a 60 dias as amostras com anelídeos demonstram um acréscimo na degradação, a qual foi gerada pela adaptação dos anelídeos ao meio e pela redução do biodiesel acumulado no solo, tornando a toxicidade menor. O período final de 60 a 90 dias foi marcado pela redução na velocidade de degradação gerada pela menor presença de biodiesel.

Nota-se que ocorreu degradação no controle em relação ao período inicial, o contato com o ar e o revolvimento semanal do solo fez com que ocorresse contaminação por microrganismos, e que parte do biodiesel se perde-se no processo de revolvimento. Tal degradação também se deve a características naturais do biodiesel, estudos já demonstraram que mesmo com um solo completamente esterilizado ainda existe degradação parcial do biodiesel (DECESARO et al, 2017).

Percebe-se uma maior inclinação na curva no período inicial nas amostras no qual ocorreu a bioestimulação, devido ao acréscimo de nutrientes e microrganismos no meio. A amostra somente com microrganismos teve comportamento próximo ao linear, isto demonstra que o acréscimo na velocidade da degradação se dá principalmente pela bioestimulação no primeiro mês, e pela bioestimulação e os anelídeos no segundo mês até o final do ensaio (90 dias).

Figura 23: Curvas de degradação do biodiesel no processo de remediação (a)

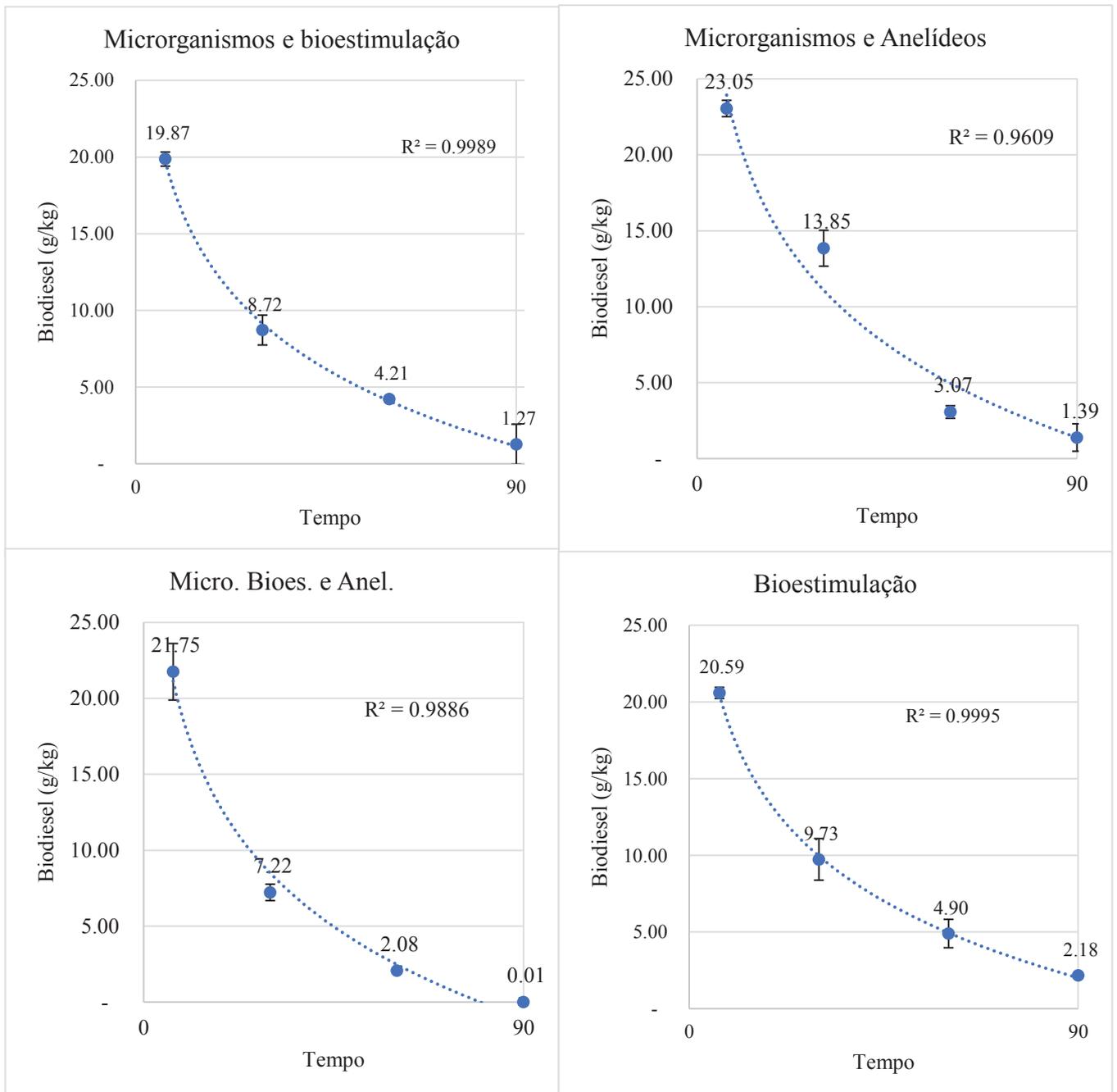
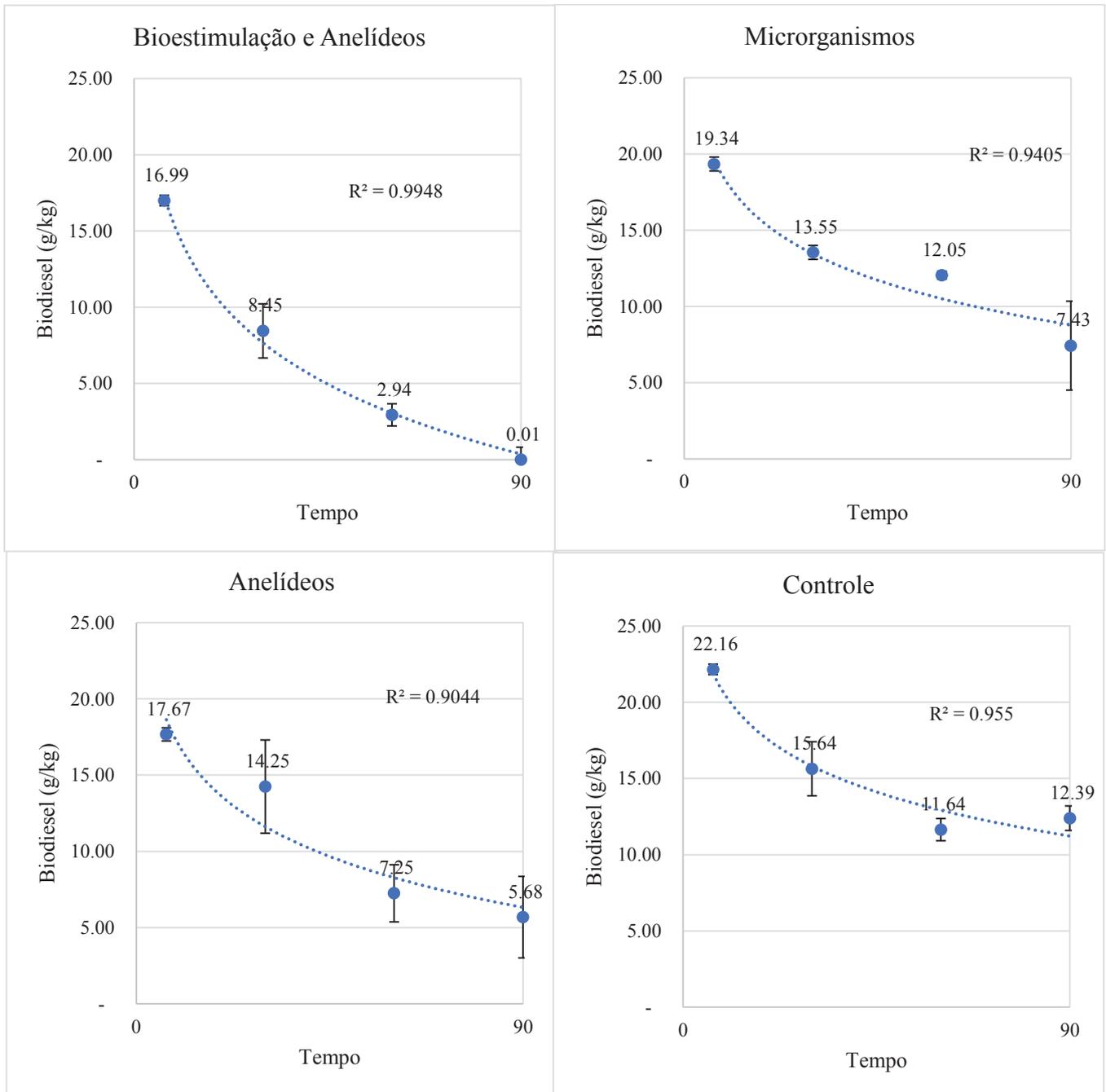


Figura 24: Curvas de degradação do biodiesel no processo de remediação (b)



#### 4.5 Análise cromatográfica das cadeias de carbono do biodiesel

Foi realizado mensalmente uma análise qualitativa da degradação do biodiesel através da cromatografia gasosa. Amostras de biodiesel extraídas por ultrassom foram encaminhadas para o laboratório de cromatografia da UPF.

Os resultados da cromatografia se encontram na Tabela 11.

Tabela 11: Análise de cromatografia do biodiesel ao longo do processo de remediação

Microorganismos e bioestimulação					Microorganismos e Anelídeos				
Dias	0	30	60	90	Dias	0	30	60	90
c16:0	14.16	35.35	31.46	0.00	c16:0	14.16	23.17	35.64	0.00
c18:0	6.25	24.00	36.04	0.00	c18:0	6.25	54.58	23.10	0.00
c18:1	29.14	40.66	32.51	0.00	c18:1	29.14	22.25	41.25	0.00
c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00	c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00
c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00	c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00
Anelídeos					Microorganismos				
Dias	0	30	60	90	Dias	0	30	60	90
c16:0	14.16	48.29	50.65	20.46	c16:0	14.16	47.36	54.94	61.31
c18:0	6.25	24.16	36.63	58.71	c18:0	6.25	23.74	29.99	37.23
c18:1	29.14	27.55	12.72	20.83	c18:1	29.14	28.90	15.07	1.46
c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00	c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00
c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00	c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00
Micro. Bioest. e Anel.					Bioestimulação				
Dias	0	30	60	90	Dias	0	30	60	90
c16:0	14.16	43.15	20.83	0.00	c16:0	14.16	41.32	51.54	16.22
c18:0	6.25	50.88	32.80	0.00	c18:0	6.25	18.15	36.14	66.56
c18:1	29.14	5.97	46.37	0.00	c18:1	29.14	40.53	12.32	17.22
c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00	c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00
c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00	c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00
Bioestimulação e Anelídeos					Controle				
Dias	0	30	60	90	Dias	0	30	60	90
c16:0	14.16	32.43	21.17	0.00	c16:0	14.16	61.38	62.24	66.06%
c18:0	6.25	20.86	38.23	0.00	c18:0	6.25	33.11	27.39	32.09
c18:1	29.14	46.71	40.60	0.00	c18:1	29.14	5.51	10.37	1.85
c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00	c18:2	43.82	0.00	0.00	0.00
c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00	c18:3	6.63	0.00	0.00	0.00

Valores em porcentagem (%)

Nota-se que as cadeias de carbono c18:3 e c18:2 desaparecem logo no primeiro mês, sendo reduzidas para c18:1, c18:0 e c16:0. A partir do segundo mês (60 dias) as cadeias de carbono c18:1 reduzem, e a leitura no tempo de 90 dias demonstra que a cadeia de carbono c18:0 se apresenta a de maior dificuldade de degradação. As cadeias de carbono em relação ao

tempo da biodegradação levando-se em consideração a quantidade de biodiesel pode ser visto na Figura 25 e Figura 26.

Figura 25: Degradação das cadeias de carbono do biodiesel ao longo do tempo (a)

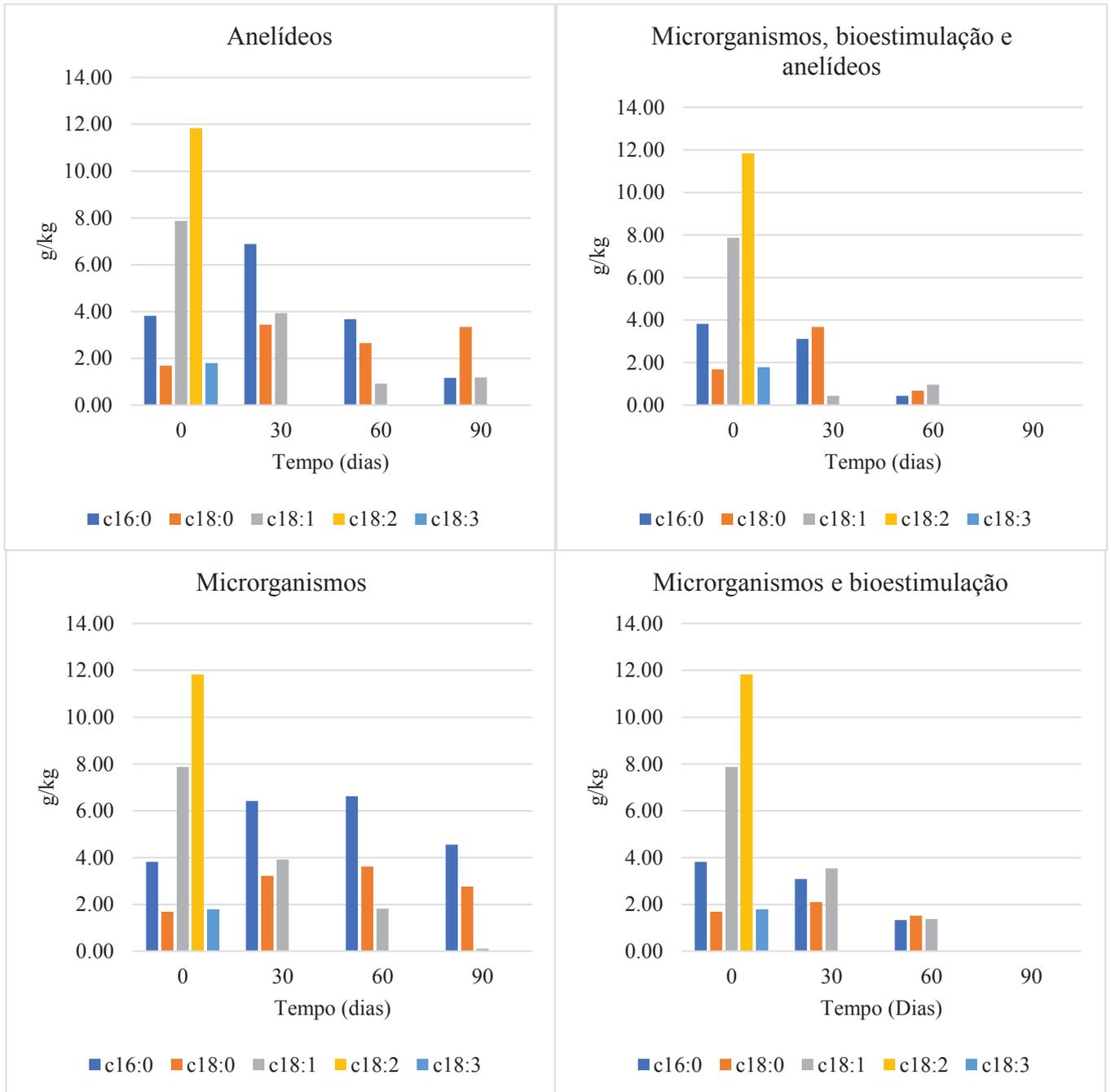
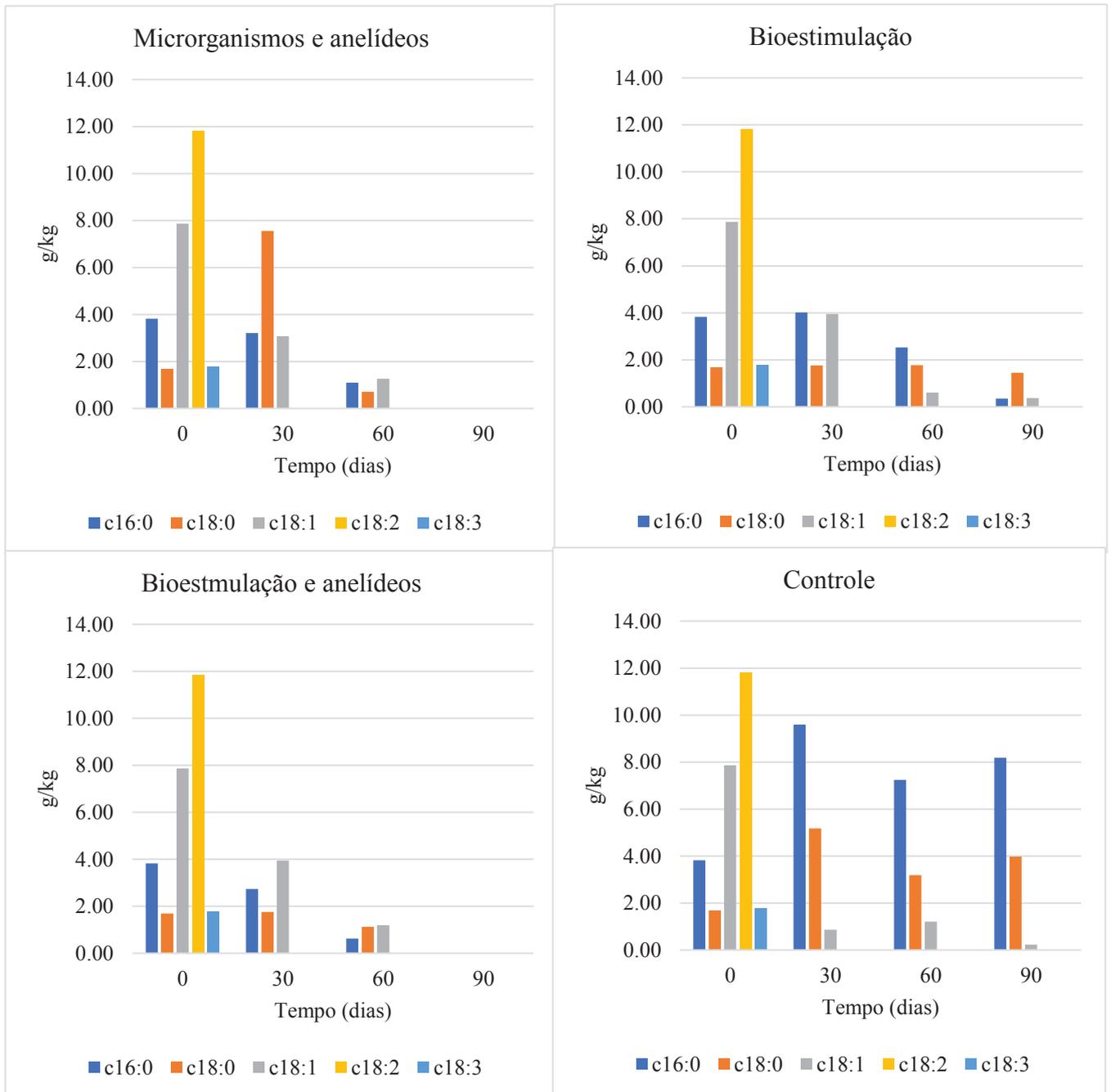


Figura 26: Degradação das cadeias do biodiesel ao longo do tempo (b)



Onde M é microrganismos, B corresponde a bioestimulação e A é anelídeos.

Em praticamente todos os casos percebe-se um aumento na quantidade de cadeias c:18:0 e c:16:0 em relação ao tempo inicial, e uma redução nas cadeias c18:3, c18:2 e c18:1. O biodiesel de cadeias maiores degradou, transformando-se em cadeias menores c:18:0 e c:16:1.

A bioestimulação foi o principal agente de degradação no mês inicial, atuando principalmente nas cadeias c16:0 e c18:0, e tendo influência menor nas cadeias c18:1, c18:2 e c18:3.

A cromatografia demonstrou que a alteração nas cadeias c18:3 e c18:2 ocorre por alguma interação química com o solo ou ar, pois em todos os casos no período final de 30 dias essas cadeias se transformaram em outras, inclusive no controle. Também nota-se que os anelídeos se demonstraram eficientes em auxiliar a degradação da cadeia c18:1 em comparação as outras amostras.

As cadeias c18:1 e c18:0 provam-se difíceis de degradar. Percebe-se uma queda significativa delas no segundo mês onde há presença de anelídeos, além de maior queda na cadeia c16:0. No primeiro mês os anelídeos tiveram um papel de auxiliar na quebra das cadeias de carbono c18:0 e c18:1, e a partir do segundo mês seu papel de auxílio é em todas as cadeias no geral.

Após o final dos primeiros dias os anelídeos passaram a sofrer menos com os efeitos do biodiesel no solo, e a ter um papel mais ativo e agitado dentro do solo e na degradação. Essa letargia inicial pode ser influência das cadeias maiores de carbono (c18:0, c18:1), visto que no final do período de 30 dias as cadeias c16:0 apresenta aproximadamente a mesma quantidade por kg de solo. Essa letargia pode ser também possível pela absorção da cadeia c18:1 pelo anelídeo e sua redução.

#### **4.6 Toxicidade da remediação aos anelídeos**

Durante o todo o período de análise, foi realizado semanalmente o acompanhamento dos anelídeos no solo. Um levantamento semanal de letalidade foi realizado, bem como realização de pesagens dos anelídeos para uma análise de adaptação e toxicidade.

Conforme a Figura 27, as amostras onde ocorreu maior letalidade foram onde não houve a presença de alimentação (bioestimulação). Nas amostras onde ocorreu esterilização do solo (autoclavado) e não ocorreu bioestimulação (amostra “A”), uma amostra inteira (10 unidades) vinham ao óbito por semana. O estresse causado pela contaminação combinado com o solo carente de microrganismos (autoclavado) e bioestimulação (alimentação) faziam com que a comunidade de anelídeos ficasse agitada e fadigasse até a morte.

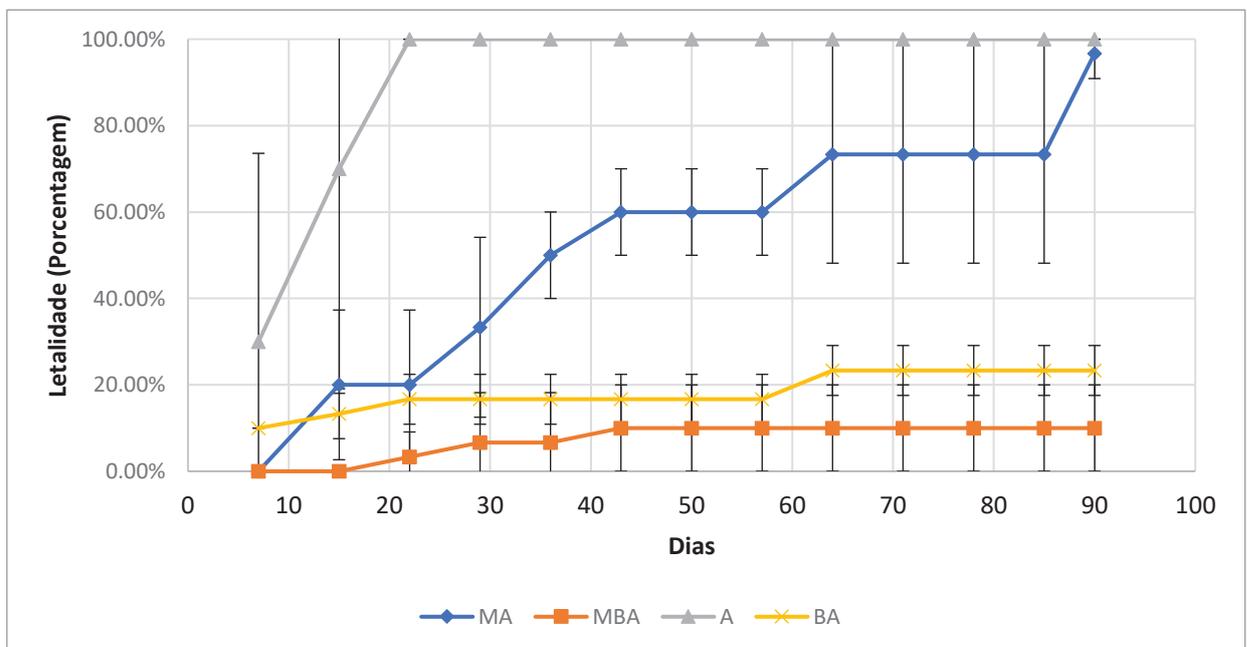
Nas amostras onde não ocorreu a bioestimulação (MA), a mortalidade foi crescente ao longo do tempo. Os óbitos iniciais na amostra “microrganismos e anelídeos” foram causados

pelo estresse da contaminação, e a mortalidade aumentou ao longo do tempo devido a abstenção de uma fonte de nutrientes. O índice de mortalidade de 15 dias foi de 17%, próximo ao resultado alcançando nos testes de toxicidade iniciais para o mesmo período de tempo. A mortalidade alcançou 96,6% no final do período de 90 dias, causado pela falta de alimentação do meio.

Nas amostras onde ocorreu bioestimulação (MBA e BA) a letalidade foi baixa no decorrer do ensaio, alcançando valores de 10% (microrganismos, bioestimulação, e anelídeos) e 23,3% (bioestimulação, e anelídeos). Portanto, o principal fator que influencia a letalidade no processo de remediação é a falta de alimentação.

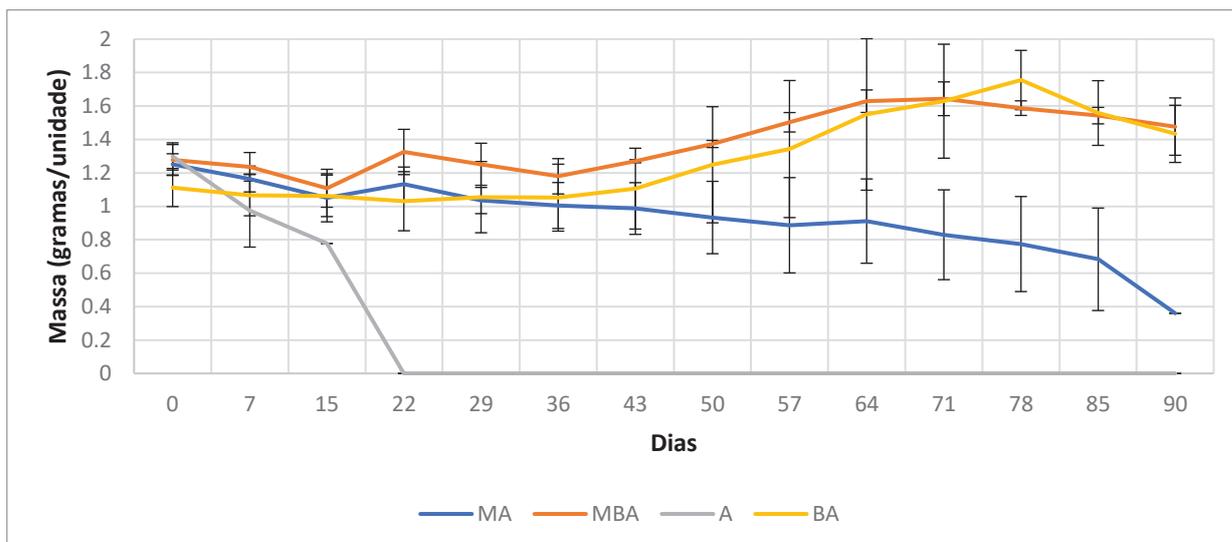
Durante todo o período inicial não ocorreu nascimento de filhotes, somente no final do terceiro mês iniciou-se o aparecimento de proles. Os filhotes apareceram somente nas amostras que ocorreu bioestimulação, e em valores baixos, tal fato demonstra que a toxicidade do biodiesel apesar de não causar letalidade elevada, causa redução na reprodução dos anelídeos. Um aumento na alimentação (bioestimulação) poderia fomentar uma maior reprodução, porém foi optado durante a realização dos testes seguir a norma de toxicidade, a qual estipula 5g/semana para 10 unidades para ensaios de toxicidade. Apesar da espécie usada na remediação (*Eudrilus eugeniae*) ser de maior porte em relação a espécie estipulada pela ISO (*Eisenia fetida*).

Figura 27: Letalidade ao longo da remediação



Onde M é microrganismos, B corresponde a bioestimulação e A é anelídeos.

Figura 28: Controle de peso ao longo da remediação



Onde M é microrganismos, B corresponde a bioestimulação e A é anelídeos.

Em relação a análise de peso, percebe-se uma perda de peso nas amostras com o solo esterilizado e sem bioestimulação (Amostra “A”). A perda foi causada pelo estresse e movimentação dos anelídeos no meio devido ao solo alienígena e a presença de contaminante. Tal característica levou a óbito rapidamente os anelídeos presentes nessas amostras.

Nas amostras sem bioestimulação onde o solo não foi esterilizado (MA), a massa unitária das minhocas foi reduzindo com o tempo, até levar a óbito 96,6% das amostras no final do período de 90 dias.

Nas amostras com bioestimulação (BA e MBA) correu um aumento de massa com o decorrer do tempo. No período inicial de 15 dias, ocorreu perda de massa em todas as amostras devido ao estresse do solo contaminado, após esse período, devido a degradação do biodiesel e a adaptação dos anelídeos ao meio, ocorreu um aumento de massa com o pico aos 71 dias para as amostras “microrganismos, bioestimulação e anelídeos” e aos 78 dias para as amostras “microrganismos e bioestimulação”.

#### 4.7 Discussão dos resultados

Os anelídeos sofrem estresse nos dias iniciais do processo de remediação devido a alta concentração do contaminante, contribuindo menos no processo degradativo do biodiesel no período inicial de 30 dias. A esterilização do solo provou-se estressante para para os anelídeos,

sendo a amostra de solo esterilizado onde ocorreu o maior índice de letalidade, afetando assim o processo degradativo destas amostras.

Nos primeiros 60 dias é onde ocorre a maior parte da degradação do biodiesel, sendo os últimos 30 dias responsáveis pela remediação do biodiesel residual, ocorrendo uma redução na taxa de degradação nesse período. O controle demonstra que o revolvimento do solo e o contato do mesmo com o ar acabada gerando processos de degradação do biodiesel, este gerado pela aeração do solo pelo processo revolvimento e a contaminação do solo por microrganismos presentes no ar.

A degradação pelos anelídeos é influenciada pelos microrganismos presentes em seu trato digestivo, pois mesmo na amostra onde ocorreu 100% de letalidade dos anelídeos, a degradação continuou por um período após a morte dos mesmos. Este fenômeno pode ser visto nas amostras A (anelídeos) onde ocorreu 100% de letalidade no final do período de 30 dias, mas o maior pico de degradação ocorreu após esse período (30 a 60 dias) conforme Figura 24. Os microrganismos presentes no trato digestivo provavelmente são responsáveis por esta degradação, no período entre 60 e 90 dias ocorre a morte desses microrganismos devido a falta do hospedeiro (anelídeo) e a degradação tende a estabilização.

Para amostras grandes de solo (1kg) demonstrou-se necessário maior cuidado para homogeneização do meio e coleta de amostras, a coleta de maior quantidade de amostras e realização de técnicas como o quarteamento são possíveis soluções para a redução da variabilidade nos resultados.

Alteração na quantidade de esterco bovino acrescentado ao número de anelídeos da amostra são fatores interessantes para estudos futuros, buscando-se assim a combinação de maior eficiência, pois a saturação ou não da área pela quantidade de anelídeos altera o comportamento deles no solo, bem como a disponibilidade de alimentação. A alteração da quantidade do esterco bovino pode afetar tanto o comportamento dos anelídeos como o dos microrganismos presentes no solo.

Os anelídeos auxiliaram da redução de todas as cadeias de carbono do biodiesel, entretando, obtiveram um maior foco de auxílio na quebra das cadeias maiores. O mesmo comportamento foi encontrado por Martinkosky (2017) para outra espécie, o autor percebeu que os anelídeos da espécie *Eisenia fetida* auxiliaram a quebra das cadeias maiores de carbono de uma contaminação em solo por petróleo bruto.

Os testes de toxicidade demonstram que é necessário confinar os anelídeos para os processos de vermirremediação de biodiesel, pois apesar de os anelídeos resistirem bem a contaminações de biodiesel (30g/kg para a espécie *Eudrilus eugeniae* e 20g/kg para a *Eisenia andrei*) ele tentem a evitar o solo contaminado em concentrações menores (20g/kg para a *Eudrilus eugeniae* e 10g/kg para a *Eisenia fetida*). A construção de reatores compostos de caixas de material poroso para a passagem de oxigenio é uma possível maneira de se realizar a vermirremediação.

Os testes de toxicidade demonstram que o biodiesel é menos tóxico para os anelídeos que outros combustíveis como o petróleo e o diesel, esse efeito de menor toxicidade do biodiesel já foi visto em vegetais e microrganismos. (HOWROT-PAW, MARTYNUS, 2011, MARIANO et al, 2008, LAPINSKIENÉ ET AL, 2006).

## 5 CONCLUSÕES

A espécie *Eudrilus euginae* apresenta maior tolerância a contaminações do solo que a espécie *Eisenia andrei*.

Os anelídeos da espécie *Eudrilus euginae* auxiliam na degradação de biodiesel em um solo argiloso residual basáltico.

A espécie *Eudrilus euginae* provou-se eficiente no auxílio na biorremediação de biodiesel em um solo argiloso residual de basalto, alcançando valores de 100% de degradação em conjunto da bioestimulação, e 94% em conjunto com os microrganismos.

O bioestimulante “esterco bovino” provou-se eficiente no auxílio da degradação do biodiesel em solo argiloso residual basáltico.

A espécie *Eisenia andrei* apresenta potencial para auxiliar áreas contaminadas com biodiesel com concentrações de contaminante de até 2%, porém ela precisa ser forçada a ter contato com a área contaminada, pois a mesma tende evitar as áreas contaminadas. Apresentando próximo a 100% de fuga para concentrações superiores a 10g/kg.

A espécie *Eudrilus euginae* apresenta uma maior tolerância a permanecer no solo contaminado que a espécie *Eisenia andrei*, apresentando fuga acima de 50% para concentrações acima de 20g/kg. A espécie também apresentou maior resistência a contaminação, havendo toxicidade somente em concentrações acima de 3%.

Na biorremediação, a bioestimulação (5g/kg/semana de esterco de bovinos) provou-se eficiente na remediação do biodiesel, alcançando valores próximos ao 100% no período de 90 dias. Sendo junto com os anelídeos os principais agentes no processo de biorremediação.

Os microrganismos presentes no trato digestivo dos anelídeos influenciam no processo de remediação, mesmo que ocorra a morte dos anelídeos do meio, os microrganismos do trato digestivo sobrevivem temporariamente e continuam o processo de degradação.

O solo contaminado e esterilizado é tóxico para os anelídeos e alcança letalidade acima de 50% em menos de 14 dias. O solo não esterilizado apresenta menor letalidade (96% de letalidade no final dos 90 dias, 15% nos primeiros 15 dias), já no solo com alimentação a letalidade é próxima a 0 durante todo o ensaio.

A cadeia c18:1 e c18:0 são as que apresentam maior dificuldade para a realização da degradação, os anelídeos particularmente auxiliaram na redução dessas cadeias, principalmente

a c18:1. As cadeias apresentaram maior redução nas amostras onde ocorreu presença dos anelídeos.

Reatores compostos de uma caixa de material poroso se demonstram uma maneira de se utilizar os anelídeos para a prática da vermirremediação em uma escala maior, pois as minhocas ficariam presas em contato com o solo contaminado. Caso as concentrações de contaminante sejam muito elevadas inicialmente para os anelídeos, podem ser reduzidas inicialmente com outros processos de biorremediação, como a bioestimulação com esterco bovino, o qual já poderá servir de alimentação complementar aos anelídeos.

## 6 RECOMENDAÇÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Realização destes ensaios com outras espécies de anelídeos.
- ✓ Mudar a quantidade de bioestimulação e número de anelídeos por amostra.
- ✓ Fazer as análises com outros tipos de solo.
- ✓ Promover análises de biorremediação utilizando anelídeos com outros tipos de contaminante.
- ✓ Realizar testes de toxicidade nas mesmas concentrações, mas em solo arenoso, para avaliar a influência do solo na toxicidade.

## REFERÊNCIAS

ABDANUR, A.; NOLASCO, M. A. Remediação de água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos em uma refinaria de óleo. **Ciência Animal**. v. 3. n. 2. p. 47-53. 2005.

ALEGBELEYE, O. O., OPEOLU, B. O., JACKSON, V. A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. **Environmental Management**. v. 60. p. 758-783. 2017.

ALI, Y., HANNA, M., CUPPETT, S. Fuel properties of tallow and soybean oil esters. **Journal of the American Oil Chemistry Society**. v. 72, p. 1557–1564. 1995

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**. v. 35. n. 3. São Paulo. p. 17-43. 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6459: Solo - Determinação do limite de liquidez**. Rio de Janeiro, 2016.

\_\_\_ **NBR 6508: Grãos de solos que passam na peneira 4.8mm – determinação de massa específica**. Rio de Janeiro, 2016.

\_\_\_ **NBR 7180: Solo - Determinação do limite de Plasticidade**. Rio de Janeiro, 2016.

\_\_\_ **NBR 17512: Qualidade do Solo – Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento, Parte 1: Ensaio com minhocas (Eisenia fétida e Eisenia andrei)**. Rio de Janeiro. 2011.

\_\_\_ **NBR 7181: Solo - Análise Granulométrica**. Rio de Janeiro, 2016.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 35 p. 317-327. 1995.

ATLAS, R. M., R. BARTHA. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. **Canadian Journal of Microbiology**. v.18 p.1851-1855. 1972.

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.

BARNWAL, B.K., SHARMA, M.P.. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.9 p.363–378. 2005.

BAROIS I.; VILLEMIN G.; LAVELLE P.; TOUTAIN F.; Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. **Geoderma**. v.56 p.57–66.1993.

BENTO, F. M. FLÁVIO, A. O. CAMARGO, B. C. OKEKE, W. T. F. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**. v. 96. p. 1049-1055. 2005.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, supl.1, p. 65-68. 2003.

BLOUIN, M., HODSON, M. E., DELGADO, E. A., BAKER, G., BRUSSARD, L., BUTT, K. R., DAI, J., DENDOOVEN, L., PERES, G., TONDOH, J. E., CLUZEAU, D., BRUN, J. -J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. **European Journal of Soil Science**. 2013. DOI: 10.1111/ejss.12025

BOOPATHY R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology** v.74(1) p.63–67. 2000.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **Microbiology Reviews**. v.26. p.73-81. 2002.

BORNSCHEUER, U. T., KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in organic synthesis – regio- and stereoselective biotransformations**. 2ªEd. Wiley-VCH. Weinheim. p.368. 2009.

BOSSERT, I., AND R. BARTHA. The fate of petroleum in soil ecosystems. **In R. M. Atlas (ed.), Petroleum microbiology**. Macmillan Publishing Co., New York. p. 434-476. 1984.

BOUCHE, M.B. Strategies lombriciennes. **In: Soil Organisms as Components of Ecosystems. Ecology Bulletin** (eds U. Lohm & T. Persson), p. 122–132. NFR, Stockholm. 1977.

BRASIL. **Decreto-Lei nº11.097, de 13 de janeiro de 2005**. 2005. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm)> Acessado 15 de novembro de 2017.

BRASIL. **Decreto-Lei nº 13.263 de 2016**. 2016. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm#art1](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm#art1)> Acessado 15 de novembro de 2017.

BROWN G. B.; DOUBE B. M. **In: Edwards Ca: Earthworm Ecology**. Second ed. Boca Raton, Fl: CRC Press; 2004. p. 213–39.

BROWN G. B.; DOUBE B. M. Interactions of earthworms with microorganism, invertebrates, and plants. **In: Edwards C. A: Earthworm Ecology**. Second ed. Boca Raton, Fl: CRC Press; . p. 213–239. 2004.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: **BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Eds.). Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia.** Londrina: Embrapa Soja, p. 297-381. 2007.

CALLAHAM, M. A.; STEWART, A. J.; ALARCÓN, C.; MCMILLEN, S. J.; Effects of earthworms (*Eisenia fetida*) and wheat (*triticum aestivum*) straw additions on selected properties of petroleum-contaminated soils. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v.21 p. 1658-1663. 2002.

CECCANTI, B.; MASCIANDARO, G.; GARCIA, C.; MACCI, C.; DONI, S.; Soil bioremediation: Combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil. **Water, Air, and Soil Pollution.** v.117 p.383-397. 2006

CECCHIN, I. **Sorção e migração de biodiesel em latossolo argiloso.** Dissertação (Mestrado em Engenharia: área de concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente). Faculdade de Engenharia e Arquitetura. Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2014.

CHACHINA S. B.; VORONKOVA N. A.; BAKLANOVA O. N. Biological remediation of the engine lubricant oil-contaminated soil with three kinds of earthworms, *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*, *Dendrobena veneta*, and a mixture of microorganism. **International Conference on Oil and Gas Engineering.** Procedia Engineering v.113. p.113-123. 2015.

CHACHINA S. B.; VORONKOVA N. A.; BAKLANOVA O. N.; Biological remediation of the petroleum and diesel contaminated soil with earthworms *Eisenia fetida*. **International Conference on Oil and Gas Engineering.** Procedia Engineering v. 152. p. 122-133. 2016.

CHEN, T. B.; ZHENG, Y.M.; LEI, M. HUANG, Z. C.; WU H. T.; CHEN, H. C.; FAN, K. K.; YU, K.; WU, X.; TIAN, Q. Z. Assessment of heavy metal pollution in surface soils of urban parks in Beijing, China. **Chemosphere.** V. 60. 2005. 542-551.

CHIARANDA, H. S. **Alterações Biogeoquímicas em Águas Subterrâneas Impactadas por Biodiesel de Soja e Misturas de Diesel/Biodiesel (B20).** 2011. 221 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011

COOKE, A.; LUXTON, M.; Effect of microbes on food selection by *Lumbricus terrestris*. **Soil biology and ecology.** v.17 p.365-370. 1980.

CUEVAS-DÍAS, M. C.; VÁZQUEZ-LUNA, D.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, S.; GUZMÁN-LÓPEZ, O.; ORTÍZ- CEBALLOS, A. I. Sensitivity of the Endogeic Tropical Earthworm *Pontoscolex corethus* to the Presence of Heavy Crude Oil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** v. 99. p. 154-160. 2017.

CURRY, J.P; SCHMIDT, O.; The feeding ecology of earthworms – A review. **Pedobiologia.** v. 50 p. 463-477.

CUSTANCE, S.R.; MCCAWE, P.A.; KOPF, A.C. & SULLIVAN, M.J. Environmental fate of the chemical mixtures: crude oil, jp-5, mineral spirits, and diesel fuel. **Soil Contam.**, 1:379-386, 1992

DARWIN, C. **The formation of Vegetable Mould through the Action of Worms, with Observations on their Habits.** John Murray. 1 Ed. p. 326. Inglaterra, 1881.

DECESARO, A., RAMPEL, A., MACHADO, T. S., THOMÉ, A. REDDY, K., MARGARITES, A. C., COLLA, M. C. Bioremediation of Soil Contaminated with Diesel and Biodiesel Fuel Using Biostimulation with Microalgae Biomass. **Journal Environment Engineering** v.143(4). 2017.

DEMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, n.54, p.894–904. 2007

DOMINGUEZ J. **In: Edwards CA: Earthworm Ecology.** Boca Raton, Florida: CRC Press; . p. 401–424. 2004.

EDWARDS C A. BOHLEN P J. **Biology and Ecology of Earthworms.** 3ed. Champman & Hall. (1996) 410 p.

EKPERUSI O, A.; AIGBODION I. F. **Bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons in diesel contaminated soil with the earthworm: *Eudrilus eugeniae*.** Springles Plus. 2015.

EKPERUSI O, A.; AIGBODION I. F. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworms: *Hyperiodrilus africanus*. **3Biotech.** v.5 p.957-965. 2015

EMATER, 2017. Disponivel em <<http://www.emater.tche.br/site/imagens/mapas/passofundo.gif>> acessado em 7 de novembro de 2017.

FARENHORST A.; TOPP E.; BOWMAN B. T.; TOMLIN A. D.; BRYAN R. B. Sorption of atrazine and metolachlor by burrow linings developed in soils with different crop residues at the surface. **Environment Science Health** v.36(4) p. 389–96. 2001.

FERNÁNDEZ, M. D., PRO, J. ALONSO, C. ARAGONESE, P., TARAZONA, J. V. Terrestrial microcosms in a feasibility study on the remediation of diesel-contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 74. p. 2133-2140. 2011.

GADD, M. G. **Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation.** **Microbiology** v. 156. p.609-643. 2010.

GALLEGO, J. L. R., LOREDO, J, LLAMAS, J. F., VÁZQUEZ, F. SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation** v. 12 p.325-335. 2001.

GERPEN, J. V. **Biodiesel processing and production. Fuel Processing Technology.** v. 86. p. 1097 – 1107. 2005

GEVAO B.; MORDAUNT C.; SEMPLE K. T.; PIEARCE T. G.; JONES K. C. Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. **Environment Science Technology** v.35 p.501–507. 2001.

GLÓROA, C. F. C. da. **Alterações físico-químicas do ambiente hídrico em consequência da contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos: o caso de estudo da Lagoa da Sancha.** Tese de mestrado (Geologia Aplicada, hidrogeologia). Universidade de Lisboa. f.79. 2016.

GOLDAMES, A.; MENDOZA, A.; ORUETA, M.; SOTO GARCÍA, I. S.; VIRTO, I.; VILAS J. L. Development of new remediation technologies for contaminated soils based on the application of zero-valent iron nanoparticles and bioremediation with compost. **Resource-Efficient Technologies.** 2017. 1-11.

GUIGUER, N. Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento. **Waterloo Hydrogeologic, Inc.** p.356. 2000

HALLARE, A. V.; RUIZ, P. L. S. CARIÑO, J. C. E. D. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. **Water, Air, and Soil Pollution.** v. 225(5) p. 1415-1424. 2014

HARITASH, A. K., KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials** v. 169. p. 1-15. 2009

HAWROT-PAW, M., MARTYNUS, M. The influence of Diesel Fuel and Biodiesel on Soil Microbial Biomass. **Polish Journal of Environment Studies** v. 20(2), p. 497-501. 2011.

HENTATI, O.; CHAKER, S.; WALL, A.; AYOUB, T.; KSIBI, M. Effects of long-term irrigation with treated wastewater on soil quality, soil-born pathogens, and living organism: Case study of the vicinity of El Hajeb (Tunisia). **Environmental Monitoring and Assessment.** v. 185(5) p. 2671-2683. 2014.

HERNÁNDEZ-CASTELLANOS, B.; ORTÍZ-CEBALLOS, A.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, S.; NOA-CARRAZANA J. C.; LUNA-GUIDO, M.; DENDOOVEN, L.; CONTRERAS-RAMOS, S. M. Removal of benzo(a)pyrene from soil using na endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus*. **Applied Soil Ecology.** V. 70. 2013. 62-69.

HICKAM Z.; REID B. J. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. **Environment International** v.34. p.1072-1081. 2008a

HICKMAN Z. A.; REID B. J. Increased microbial catabolic activity in diesel contaminated soil following addition of earthworms (*Dendrobaena veneta*) and compost. **Soil Biology and Biochemistry**. v.40. p. 2970–2976. 2008b.

IBGE, 2017. Disponível em <<https://biblioteca.ibge.gov.br>>. Acessado em 7 de novembro de 2017.

IFEOLUWA, B.; TODD, A. A. Phytotoxicity of three plant-based biodiesels, unmodified castor oil, and Diesel fuel to alfafa (*Medicago sativa* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.), radish (*Raphanus sativus*), and wheatgrass (*Triticum aestivum*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 122. p. 268-274. 2015

ISO 11268-2. **Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms -Part 2: Determination on effects on reproduction of Eisenia fetida/Eusemia Andrei**. p.21. 2012

JAHIRUL, M., BROWN, R., SENADEERA, W., O'HARA, I., RISTOVSKI, Z. . The use of artificial neural networks for identifying sustainable biodiesel feedstocks. **Energies**, v. 6, p. 3764-3806. 2013.

JARUP, L. Hazards of Heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**. V. 68. 2003. 167.182.

KAUR, G.; HUNDAL, S. S.; Bioremediation of Heavy Metal Contaminated Soil using Earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Environment**, V. 4. 2015. 25-29.

KHAN, S.; SIDDIQUE, R.; SAJJAD, W.; NABI, G.; HAYAT, K. M.; DUAN, P.; YAO, L. Biodiesel Production From Algae to Overcome the Energy Crisis. **HAYATI Journal of Biosciences**. v. 24. p. 163-167. 2017.

KIM, J. LEE, A. H., CHANG, W. Enhanced bioremediation of nutrient-amended, petroleum hydrocarbon-contaminated soils over a cold-climate winter: The rate and extent of hydrocarbon biodegradation and microbial response in a pilot-scale biopile subjected to natural seasonal freeze-thaw temperatures. **Science of the Total Environment**. v. 612. p. 903-913. 2018.

LANGDON C. J.; PIEARCE T. G.; MEHARG, A. A. Semple, Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. **Environment Pollution**. v.24 p 361–373. 2003.

LAPINSKIENÉ A, MARTINKUS P, REBZDAITE V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environment Pollution**. v. 142 p.432-437. 2006.

LAVELLE P.; BLANCHART E.; MARTIN A. Impact of soil fauna on the properties of soils in the humid tropics. In: **Sanchez PA, Lal R, editors. Myths and Science of Soils in the Tropics**, v. 29. SSSA Special publication; . p. 157–85. Madison, WI. 1993.

LAVELLE P.; PASHANASI B.; CHARPENTIER F.; GILOT C.; ROSSII J-P.; DEROUARD L.; ANDRE, J., PONGE, J. F., BERNIER, N. Effects of Earthworms on Soil Organic and Nutrient Dynamics at a landscape Scale over decades. **In: Edwards CA: Earthworm Ecology. Second ed. Boca Raton, FL: CRC Press; . p. 145–160. 2004.**

LAVELLE P.; PASHANASI B.; CHARPENTIER F.; GILOT C.; ROSSII J-P.; DEROUARD L.; et al. **In: Edwards CA: Earthworm Ecology. Second ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004. p. 145–60.**

LEE, K. E., FOSTER, R. C. Soil Fauna and Soil Structure. **Australian Journal of Soil Research** v.29. p. 754-775. 1991.

Lee, K.E. Earthworms their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. **Academic Press, Sydney.** p. 411. 1985.

LIN, Z. BAI, J. ZHEN, Z.; LAO, S. LI, W. WU, Z.; LI, Y. SPIRO, B.; ZHANG, D., Enhancing pentachlorophenol degradation by vermicomposting associated bioremediation. **Ecological Engineering.** v. 87. p. 288–294. 2016a.

LIN, Z.; ZHEN, Z.; WU, Z.; YANG, J.; ZHONG, L.; HU, H.; LUO, C.; BAI, J.; LI, Y.; ZHANG, D. The impact on the soil microbial community and enzyme activity of two earthworm species during the bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soils. **Hazard Materials.** v.301 p. 35-45. 2016b.

LIU, G.; LING, S.; ZHAN, X.; LIN, Z.; ZHANG, W.; LIN, K. Interaction effects and mechanism of Pb pollution and soil microorganism in the presence of earthworm. **Chemosphere,** 173. 2017. 227-234.

MAGALHÃES, L. C. **Estudo do material particulado atmosférico e metais associados às partículas totais em suspensão na cidade de Ouro Preto, MG.** Tese de mestrado (Engenharia Ambiental – Uso e conservação de recursos hídricos). Universidade Federal de Ouro Preto. 2005. P. 81.

MAIER R. M. Bioavailability and Its importance to Bioremediation. **In: Valdes J.J. (eds) Bioremediation.** Springer p. 59-78. 2000. DOI: 10.1007/978-94-015-9425-7

MARIANO, A. P., TOMASELLA, R. C., OLIVEIRA, L. M. de, CONTIERO, J., ANGELIS, D. F. de. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology.** v. 7. p. 1323-1328. 2008.

MARTIN A. Short- and long-term effects of the endogeic earthworm *Millsonia anomala* (Omodeo) (Megascolecidae, Oligochæta) of tropical savannas, on soil organic matter. **Biology and Fertility of Soils** v.11(3) p234–238. 1991

MARTINKOSKY, L.; BARKLEY J.; SABADELL G.; GOUGH H.; DAVIDSON S. Earthworms (*Eisenia fetida*) demonstrate potential for use in soil bioremediation by increasing the degradation rates of heavy crude oil hydrocarbons. **Science of The Total Environment** v.580 p.734-743. 2017.

MATZENAUER, R; RADIN, Be ; ALMEIDA, I. **Atlas Climático: Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura Pecuária e Agronegócio; Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), 2011.

Mckenzie B. M.; Dexter A. R. Physical properties of casts of the earthworm *Aporrectodea rosea*. **Biology and Fertility of Soils** v.5 n.2 p.152-157. 2004.

MEHARG A. A. Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 28 n.4/5 p. 555-559. 1996.

MEHER, L. C., SAGAR, D., NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 10. p. 248 – 268. 2006

MENEGHETTI, L. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia: área de concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente). Faculdade de Engenharia e Arquitetura. Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2007.

MIGGE-KLEIAN, S., MCLEAN, M. A., MAERZ, J. C., HENEGHAN, L. The influence of invasive earthworms on indigenous fauna in ecosystems previously uninhabited by earthworms. **Biological Invasions** v.8 p. 1275-1285. 2006

MOODY, S. A. BRIONES, M.J.I.; PIERCE, T.G.; DIGHTON, J.; Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**. v.27. p.1209-1213.1995

MOONEY, T. J.; KING, C. K.; WASLEY, J., ANDREW, N.R. Toxicity of diesel contained soils to the subanttrtic earthworm *Microscolex macquariensis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 32(2) p. 370-377. 2013.

NAHMANI, J.; LAVELLE, P. Effects of heavy metal pollution on soil macrofaunal in a grassland of Northern France. **European Journal of Soil Biology**. V. 38. 2002. 297-300.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid phase bioremediations of diesel contaminated soil. **Hazard. Materials.**, v. 100 p.79-94. 2003.

NEILSON, R.; BOAG, B.; Feeding preferences of some earthworm species common to upland pastures in Scotland. **Pedobiologia**. v.47 p. 895-899. 2003

NJOKU, K. L.; NOMBA, E. U.; OLATUNDE, A. M.; Vermiremediation of Crude Oil Contaminated Soil Using *Eudrillus euginae* and *Lumbricus terrestris*. **Journal Biological Environment Sciences**. v. 11. p. 43-50. 2017.

OADES, J. M. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. **Geoderma** v.56. p. 377-400. 1993.

OECD. Earthworm, Acute Toxicity Tests. p.9. 1984. Disponível em <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948293.pdf>> Acessado em 4 de novembro de 2017.

PATTNAIK S.; REDDY M. V. Remediation of heavy metal from urban waste by vermicomposting using earthworms: *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia fetida* and *Perionyx excavates*. **International Journal Of Environment and Waste Management**. v. 10 p.284-296. 2012

PETERSON C., REECE D. **Toxicology, biodegradability and environmental benefits of biodiesel**. Department of Agricultural Engineering, University of Idaho, 1994

PINTO A.C., GUARIEIRO L. L. N., REZENDE M. J. C., RIBEIRO N. M., TORRES E. A., LOPES W. A., PEREIRA P. A. P., ANDRADE J. B.. Biodiesel: An Overview. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. v. 16 n.6. p. 1313-1330. 2005.

POLYAK, Y. M., BAKINA L. G., CHUGUNOVA, M. V., MAYACHKINA, N. V., GERASIMOV, A. O., BURE, V. M. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil – A field study. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 126. p. 57-68. 2018

REDDY, K. R., ADMAS, J. F., RICHARDSON, C. Potential technologies for remediation of Brownfield. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management**. v. 3, p.61-68. 1999.

REGINATTO, C. **Bioventilação em um solo argiloso contaminado com mistura de diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia: área de concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente). Faculdade de Engenharia e Arquitetura. Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2012.

REID B., FERMOR T. R.; SEMPLE K.T. Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil-associated phenanthrene. **Environment Pollution**. v.118 n.1 p. 65-73. 2002.

REYNOLDS, J. W.; WETZEL, M. J. **Nomeclatura Oligochaetologica, suplementum quartum**. Champaign: Illinois Natural History Survey Special Publication, 2007 (no prelo). <http://www.inhs.uiuc.edu/~mjwetz/Nomen.Oligo.html>.

RODRÍGUEZ, R. P.; BORROTO, Y. S.; ESPINOSA, E. A.; VERHELST, S. Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 69 p. 833-842. 2017.

ROMANTSCHUCK M.; SARAND I.; PETANEN T.; PELTOLA R.; JONSSON-VIHANNE M.; KOIVULA T.; et al. Means to improve the effect of in-situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. **Environment Pollution** v.107 p.179–185. 2000.

SAFDARI, M. S., KARIMINIA, H. R., RAHMATI, M., FAZLOLLAHI, F., POLASKO, A., MAHENDRA, S., WILDING, W. V., FLETCHER, T. H. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials** v. 342. p. 270-278. 2018

SANFORD, S.D. ET AL., 2009. **Feedstock and Biodiesel Characteristics Report**. Renewable Energy Group, Inc.. <http://www.regfuel.com>.

SANTOS, M. M. **Caracterização bioquímica de uma esterase halofílica de *Haloarcula marismortui***. Tese de doutorado (Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. F. 157. 2009.

SCHAEFER, M. The landfill of TBT contaminated harbour sludge on rising fields - A hazard for the soil fauna? Risk assessment with earthworms. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 165 (1-4) p. 265-278. 2005.

SCHAFER, M., FILSER, J. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. **Applied soil ecology**. v.36. p.53-62. 2007.

SCHAFER, M., JULIANE, F. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. **Applied soil ecology**. v.36. p.53-62. 2007.

SCHEU S. Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (Lumbricidae). **Biology and Fertility of Soils**. v. 5. p.230-234. 1987.

SCHIEDECK, G., GONÇALVEZM, M. M., SCHWENGBER, J. E., SCHIAVON, G. A. Minhocultura em camadas: um manejo ara otimizar o minhocário na propriedade familiar. **Comunicado Técnico**. v. 172. p.1-4. 2007. ISSN 1806-9185

SCMITZ, R., DECESARO, A., SANTETI, G., REINEHR, C. O., THOMÉ, A., COLLA, L. M. Lipídios microalgais utilizados como biossurfactantes em processo de biorremediação de diesel e biodiesel em solo. **Ciência & Engenharia** v. 24. p.63-70. 2015

SCOPUS. 2017. Disponível em: < <https://www.scopus.com>>.

SHAY EG. Diesel fuel from vegetable oil: status and opportunities. **Biomass Bioenergy** v. 4. P. 227-242. 1993.

SIMS, R.C. Soil remediation techniques at uncontrolled hazardous waste sites. **Journal of the Air & Waste Management Association**. v.40 n.5 p. 703-732.1990.

SINGER, A. C.; JURY, W.; LUEPROMCHAI, E.; YAHNG, C.-S.; CROWLEY, D. E. Contribution of earthworms to PCB bioremediation. **Soil Biology & Biochemistry**. V. 33. 2001. 765-776.

STEFFEN, G. P. K. **Diversidade de minhocas e sua relação com ecossistemas naturais e alterados no estado do Rio Grande do Sul**. Tese de doutorado (Ciência do solo). Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). F. 208. 2012.

STRECK, E. V. et al. Solos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 222 p.

TAMADA, I. S.; MONTAGNOLLI, R. P.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E.D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 1576=1581. 2012

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. E VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p

THOMÉ, A., CECCHIN, I., REGINATTO, C., COLLA, L. M., REDDY, K. R. Biostimulation and rainfall infiltration: influence on retention of biodiesel in residual clayey soil. **Environment Science Pollution Research**. v. 24. p. 9594-9604. 2017.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Method 3550B, ultrasonic extraction**, 1996.. Disponível em < <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3550c.pdf>> acesso em: 6 de Novembro de 2017.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Seminars Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation (EPA/625/K-96/001.)**. p. 130. 1996. Disponível em < <https://permanent.access.gpo.gov/lps34511/biohaz1.pdf>> Acessado em 8 de novembro de 2017.

VASANTHA-SRINIVASAN, P.; SENTHIL-NATHAN, S.; PONSANKAR, A. THANIGAIVEL, A. CHELLAPPANDIAN, M. EDWIN, E. S.; SELIN-RANI, S.; KALAIVANI, K. HUNTER, W. B.. DURAI PANDIYAN, V.; AL-DHABI, N. A. Acute toxicity of chemical pesticides and plant-derived essential in oil on the behavior and development of earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kingberg) and *Eisenia fetida* (Savigny). **Environment Science Pollution Research**. v. 25. p.10371 - 10382. 2018;

VIEIRA, L. V. KLEIN, V. A. Propriedades físico-hídricas de um latossolo vermelho submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de ciência do solo**. v. 31. p.1271-1280. 2007.

