



## II-192 – AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BENZENO EM REATORES EM BATELADA INOCULADOS COM *Aspergillus niger* AN400

**Zuleika Bezerra Pinheiro**<sup>(1)</sup>

Curso de Tecnologia em Gestão Ambiental – CEFETCE. Bolsista Iniciação Científica - CNPq

**Eloiza Pinheiro Damasceno**

Graduada em Tecnologia em Gestão Ambiental – CEFETCE

**Kelly Rodrigues**

Engenheira Civil, Doutora Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Profa. da Área de Química e Meio Ambiente – CEFETCE

**Glória Maria Marinho Silva Sampaio**

Farmacêutica - Bioquímica, Doutora Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Profa. da Área de Química e Meio Ambiente – CEFETCE

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Rua Martinho Rodrigues, 1301 ap 903 bloco B – Fátima - Fortaleza - CE - CEP: 60411-280 - Brasil - Tel: (85) 3247-1264 - e-mail: [zuleika.cefetce@yahoo.com.br](mailto:zuleika.cefetce@yahoo.com.br)

### RESUMO

O petróleo e seus derivados contém uma complexa mistura de hidrocarbonetos que podem ser caracterizados em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. A fração saturada inclui as cadeias de alcanos lineares, alcanos ramificados e cicloalcanos. A fração aromática contém hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno; hidrocarbonetos poliaromáticos, naftenoaromáticos e compostos aromáticos de enxofre. O benzeno é um hidrocarboneto aromático que se apresenta como um líquido incolor, lipossolúvel, volátil, inflamável, de odor característico, perceptível à concentrações da ordem de 12 ppm. Estes compostos são considerados carcinogênicos, mesmo em baixas concentrações. Pesquisas com processos biológicos e microrganismos capazes de degradar compostos do petróleo vêm crescendo consideravelmente. A fim de avaliar a biodegradação desses compostos gerando um monitoramento eficiente para proteger o ambiente de potenciais contaminações, o presente trabalho propõe estudar a capacidade de degradação de benzeno de um efluente sintético em reatores em batelada, inoculados com fungos da linhagem *Aspergillus niger* AN400. Para estes estudos foram utilizadas três diferentes concentrações de benzeno (10%, 5%, e 1%), divididas em três lotes: reatores de controle (C), contendo apenas efluente sintético; reatores com fungos (RF), contendo efluente sintético e fungo; reatores com fungo e glicose (RFG), contendo efluente sintético, fungo e glicose. O experimento foi conduzido por um período de cinco dias, a cada 24 h alíquotas eram retiradas para procedimentos das análises. As variáveis analisadas foram: DQO (demanda química orgânica), pH, benzeno e SSV (sólidos suspensos voláteis). Os resultados mostraram que houve eficiência na remoção de DQO de aproximadamente 70% nos reatores com fungo e glicose (RFG) e 76% para os reatores com fungo (RF). Portanto, os resultados deste estudo demonstraram a capacidade de degradação do *Aspergillus niger* AN 400 frente a matéria orgânica carbonácea em concentrações de benzeno de até 10%. As análises de benzeno encontram-se em execução.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus niger* AN 400, reatores em batelada, benzeno.

### INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados contém uma complexa mistura de hidrocarbonetos que podem ser caracterizados simplificada em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos, a fração saturada inclui as cadeias de alcanos lineares, alcanos ramificados e cicloalcanos. A fração aromática contém hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, tais como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), naftenoaromáticos e compostos aromáticos de enxofre. Os HPAs constituem a fração de hidrocarbonetos associados a contaminação por óleos, os quais também possuem propriedades carcinogênicas, mutagênicas e tóxicas (KAIPPER e CORSEIL, 2004)

A exposição humana aos HPAs se dá principalmente através da contaminação ambiental. Estes hidrocarbonetos podem ser encontrados tanto no ar, quanto no solo, na água, em plantas e alimentos. Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação



humana por estas substâncias é significativo. Devido ao seu caráter lipofílico, os HPAs e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo PEREIRA NETO et al. 2000.

A proteção do meio ambiente contra agentes poluidores de origem industrial é um problema complexo para os países em desenvolvimento. Em assim sendo, torna-se necessário caracterizar as diferentes formas de contaminação do meio ambiente causada pela atividade industrial, sem restringir o desenvolvimento sócio-econômico de um país, mantendo o desenvolvimento sustentável (ARTHAUD, 2005).

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos, na sua maioria, aeróbios, produzem longos filamentos chamados de hifas, cujo conjunto forma uma massa chamada micélio. São componentes significantes da microflora do solo, vivem também nos vegetais e na água. Espalham-se amplamente pela natureza, em consequência da produção de elementos de disseminação – os propágulos, sendo o ar atmosférico uma das vias de disseminação. Os fungos dispersos pelo ar são chamados de anemófilos e os mais frequentes das regiões do Brasil pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Helmithosporium* e *Trichoderma* (BITTON, 1994; TRABULSI, 1999).

Como atividade microbiana destaca-se como importante fator na eliminação de produtos químicos do ambiente. Os fungos têm sido amplamente empregados, em processos biológicos, para remoção de compostos de difícil degradação, pois são capazes de reciclar compostos como lignina, celulose, quitina, melanina e queratina, além de serem altamente versáteis no metabolismo de xenobióticos (PRENAFETA BOLDU, 2002).

Considerando a habilidade dos fungos em degradar compostos persistentes, a crescente contaminação por petróleo e seus derivados, a escassez de água de qualidade e os custos da maioria dos processos de natureza físico-químico, esta pesquisa tem como principal objetivo empregar o tratamento biológico para remoção/degradação de compostos persistentes presentes em água residuária de indústria de refinamento de petróleo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultivo e produção dos esporos de *Aspergillus niger* AN400

Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram cultivados, em placas de Petri estéreis, no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do CEFETCE, contendo 15 mL de meio de cultura Sabouraud, meio específico para crescimento dos fungos, sendo uma mistura de peptonas, agar-ágar, 2% de dextrose e glicose, o qual foi previamente esterilizado a 122°C, durante, 15 minutos. Adicionou-se ainda às placas, solução de Vischiniac (solução de nutrientes), na concentração de 1 mL/L de meio de cultura, como fonte de nutrientes para os fungos.

Após a solidificação do meio de cultura, os esporos foram inoculados nas placas e estas foram mantidas sob temperatura de 28°C por 7 dias.

A remoção dos esporos foi realizada com solução Tween 80, e a suspensão de esporos formada foi removida com uso de pipeta automática, previamente esterilizada, e transferida para frasco de 200 mL, e mantida sob refrigeração.

### Contagem dos esporos

A suspensão de esporos foi descongelada e agitada para melhor homogeneização. A contagem dos esporos foi efetuada em microscópio óptico, com aumento de 45 vezes, retirando-se do frasco 50 µL da suspensão de esporos, a qual foi diluída em solução Tween 80, na diluição de 1:20. Em seguida foi removido 20 µL da suspensão de esporos e transferido para câmara de Neubauer para contagem.

A partir da concentração resultante da suspensão mãe de esporos ( $2,9 \times 10^9$  esporos/mL), foram calculados os volumes a serem adicionados aos reatores, na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL.

### Água residuária

A água residuária sintética utilizada foi preparada com água destilada, adicionada de 1mL/L de Vischiniac (solução de nutrientes), 50 mg/L de cloranfenicol e fenol nas seguintes concentrações: 1000 mg/L; 500 mg/L; 250 mg/L e 100 mg/L.



### Reatores em batelada

Foram usados 18 reatores constituídos de frascos cilíndricos em vidro, com tampa rosqueável e com volume total de 2,5 L, e volume útil de 500 ml, os quais foram previamente desinfetados com ácido clorídrico 3M.

Para cada uma das 3 concentrações de benzeno estudadas (10%, 5% e 1%) formou-se um grupo de reatores em duplicata composto por: 6 de controle (C), contendo apenas o efluente sintético; 6 com efluente sintético e fungos (RF) e 6 com efluente sintético, fungos e 0,5g/L de glicose (RFG).

De acordo com o tempo de reação foram retiradas alíquotas (10 mL) dos reatores a cada 24 horas, durante cinco dias, para a determinação das variáveis.

### Variáveis analisadas

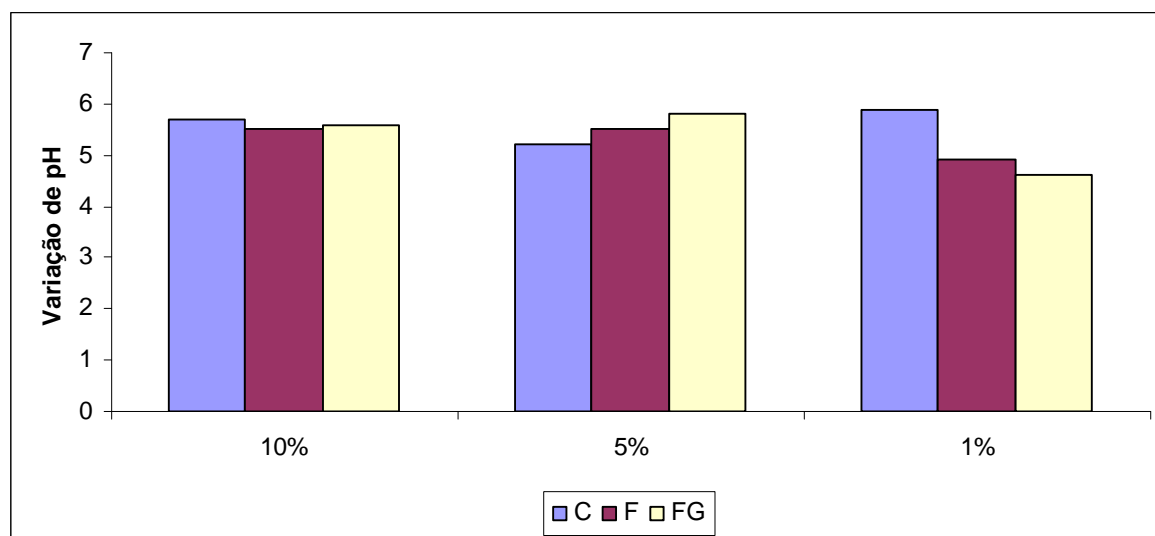
As variáveis analisadas foram: DQO, SSV, benzeno e pH, de acordo com APHA (1998), exceto benzeno, cuja determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Gilson mod. 321, equipado com detector UV-VIS), coluna Varian Microsorb – MV 100-5 C18 250 x 4.6 mm, sistema isocrático com fase móvel metanol/água (70:30 v/v),  $\lambda = 260$  nm, Q = 0.075 mL/min e volume de injeção de 20  $\mu$ L.

## RESULTADOS

### Variação de pH

Os valores de pH nos reatores de controle (C) permaneceram entre 5,5 e 6,0 e nos reatores F e FG os valores variaram entre 6,0 e 4,5 como podem ser observados na Figura 1.

Figura 1– Variação do pH



Segundo Wheller et al. (1991) o gênero *Aspergillus niger* desenvolve-se bem em faixas de pH variando entre 3,30 e 7,50, como verificado nesta pesquisa. Em outras pesquisas, como nas de Oliveira et al. (2006) e de Félix et al. (2006), o pH foi ajustado artificialmente no início do experimento, a uma faixa propícia para o crescimento do fungo que é em torno de 4 a 5. Neste experimento, optou-se em não realizar o ajuste do pH, para avaliar a eficiência do fungo sob condições naturais para esta variável, assim, diminuindo os custos do tratamento. O pH atingiu valores menores nos reatores FG, indicando maior atividade metabólica nos reatores onde os fungos dispunham inicialmente de glicose devido à maior produção de ácidos orgânicos, a partir do consumo do referido substrato primário (Rodrigues, 2007). Cai et al. (2007), ao avaliar a degradação de fenol por *Fusarium* sp. sob diferentes valores de pH, verificou que esta espécie foi capaz de degradar completamente 420 mg/L de fenol em oito dias de incubação com pH de 4 a 8, enquanto que, com pH 2, a degradação completa levou mais tempo e, com pH 10, não houve crescimento do fungo. Andrade et al., (2008) avaliando a remoção de fenol em reatores em batelada, alcançou valores de pH entre 2 e 4. Segundo os

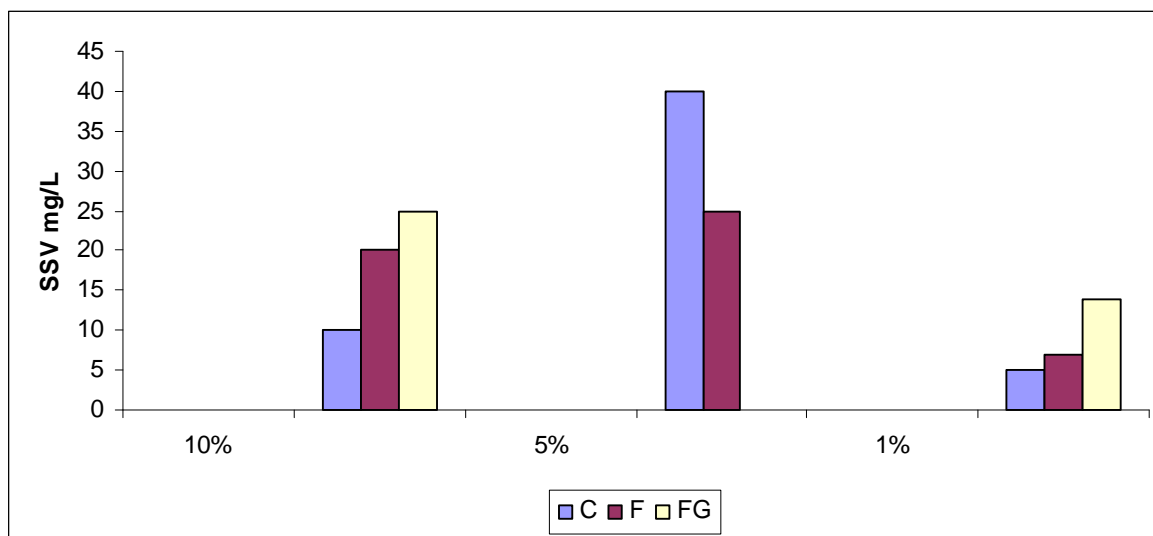
autores, isso mostra o reflexo da atividade de biodegradação do fenol, visto que, quando metaboliza este composto os fungos em geral liberam ácidos orgânicos provenientes da sua degradação.

### Variação de SSV

Como mostrado na Figura 2, os reatores com concentração de 10% houve um crescimento de aproximadamente 24% nos reatores FG, 20% nos reatores F. Nos reatores com concentração de 5% o crescimento da biomassa foi de aproximadamente 25% nos reatores F, já nos reatores FG não houve crescimento da biomassa. Na concentração de 1% houve um crescimento de 7% nos reatores F e 13% nos reatores FG. O aumento dos resultados de SSV nos reatores de controle C permitiu observar que houve um crescimento de biomassa, indicando que esses reatores possivelmente foram contaminados por outros microrganismos. Pode-se observar também que nos reatores que continham glicose houve um maior crescimento da biomassa isso ocorre possivelmente pela fácil assimilação do fungo a esse co-substrato.

Damasceno et al., (2007) ao trabalhar com reatores em batelada com efluente petroquímico, alcançou resultados de SSV nos reatores que continham açúcar como fonte primária de carbono superior aos valores dos reatores sem a adição desse substrato. Os valores alcançados foram de 76 mg/L com dois dias de operação havendo uma diminuição desse valor no final do experimento para 35 mg/L, segundo os autores essa diminuição da biomassa após alcançar um crescimento máximo ocorreu, provavelmente devido a exaustão de nutrientes no meio, os autores afirmam também, que houve crescimento nos reatores que não continham açúcar, com valores entre 12 mg/L e 35 mg/L, atribuindo também que possivelmente, a presença do açúcar tenha promovido uma adaptação do fungo à água residuária, o que possibilitou melhores condições para que o crescimento da biomassa fosse maior no reator com a adição de substrato primário que no reator que não continha esse co-substrato.

**Figura 2**– Variação de SSV



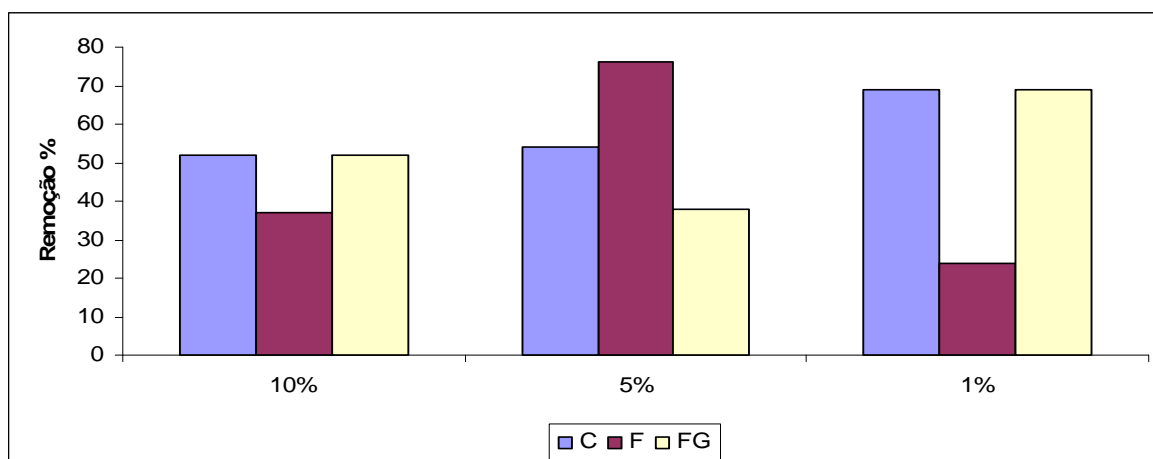
### Variação de DQO

Nos reatores FG houve uma remoção de 52%, 38% e 69% nas concentrações de 10%, 5% e 1% respectivamente. Observou-se que nos reatores de concentração de 1% houve uma maior remoção da matéria orgânica, possivelmente isso ocorreu pelo fato de haver uma baixa carga orgânica e que ao esgotar a glicose o fungo assimilou com maior facilidade esse substrato. Nos reatores F a remoção foi de 37%, 76% e 34% nas concentrações de 10%, 5% e 1%. Pode-se observar que a remoção nos reatores F na concentração de 5% foi maior que nos reatores FG, possivelmente a quantidade de glicose pode ter sido elevada impedindo assim a assimilação com a matéria orgânica. Pode-se observar que também houve uma remoção significativa nos reatores de controle, que possivelmente deve ter sido contaminada com outros microrganismos. A variação de DQO pode ser observada na Figuras 3. Igualmente a outros trabalhos da literatura, que, quando se comparou o tratamento de águas residuárias com e sem a adição de glicose, usada como substrato primário, a biodegradação de matéria orgânica foi mais eficiente quando do uso deste co-substrato, como o de Rodrigues



(2006), que alcançou uma remoção de 27% para reatores sem glicose e uma remoção de 100% nos reatores com glicose, e os de Félix (2006) atingindo valores de remoção 59% em reatores sem glicose e de 82% em reatores com glicose. Pode se observar que houve variações constantes quanto a remoção de matéria orgânica. Segundo Wanderley (2007) a instabilidade na remoção de matéria orgânica pode estar relacionada com a presença de subprodutos formados no meio, ou mesmo substâncias excretadas pelos fungos oriundas do seu metabolismo. A glicose é um composto mais facilmente degradado, resultando no aumento mais rápido da biomassa, e, conseqüentemente, da eficiência de remoção de matéria orgânica, devido seu maior consumo pela população microbiana (RODRIGUES, 2007).

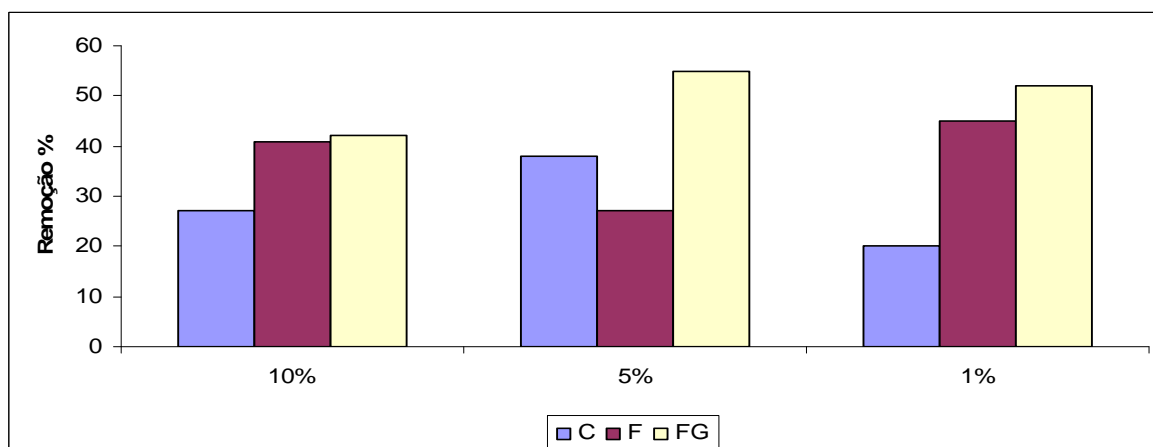
**Figura 3–** Variação de DQO



### Variação de Benzeno

A Figura 4 mostra que, ao final do experimento a remoção de benzeno foi de aproximadamente 40% nos reatores com fungo e 50% nos reatores com fungo e glicose em todas as concentrações estudadas. Sampaio et al., (2005) estudaram o efeito da glicose na remoção de Metil Paration, um inseticida, por fungo *Aspergillus niger* AN 400 e constataram que a velocidade de conversão deste substrato foi melhor com a adição de uma fonte de carbono primária. Usando a mesma espécie fúngica, Rodrigues et al., (2007) concluíram que em seu estudo com efluente sintético contendo fenol a velocidade de consumo em seu reator RFG foi maior, de modo que a presença de glicose influenciou na aceleração da remoção do substrato. Houve também uma remoção de aproximadamente 25% nos reatores de controle, possivelmente os mesmos podem ter sido contaminados por outros microrganismos ocasionando assim a remoção desse composto. Lacerda ao trabalhar com benzeno a uma concentração de 100 mg/L sob agitação obteve resultados de remoção de 33,4% com 14 dias de operação. Segundo Brito a alta toxicidade do composto pode ter estressado o fungo e inibido o seu metabolismo.

**Figura 4–** Variação de Benzeno





## CONCLUSÕES

Com base nesse estudo, concluiu-se que:

Os resultados deste estudo demonstraram a capacidade de degradação de matéria orgânica por *Aspergillus niger* AN 400 em concentrações de benzeno de até 10%.

As altas concentrações de Benzeno não inibiram o crescimento do fungo mostrando assim uma boa adaptação ao meio.

A glicose co-substrato influenciou positivamente a remoção de matéria orgânica expressa em DQO e na remoção de Benzeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA – AWWA – WEF Standard methods for the examination of water and wastewater 19<sup>th</sup>, Washington DC, USA, 1999
2. ARTHAUD, I. D. B. (2005). Redução de toxicidade do efluente de uma refinaria de petróleo, empregando reatores biológicos aeróbios, de leito fixo e fluxo ascendente, inoculados com *Aspergillus niger*. Universidade Federal do Ceará - Mestrado em Engenharia Civil – Saneamento Ambiental.
3. BITTON, GABRIEL. Wastewater microbiology. New York, 17-19p. 1994.
4. CORSEUIL H. X., KAIPPER B. I. A. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. Water Research, V. 38, p. 1449-1456. 2004.
5. Damasceno P. E.; PINHEIRO, B. Z.; SAMPAIO, S. M. M. G., RODRIGUES. K.; ARAÚJO, D. S. R. Tratamento Biológico de efluentes de Indústria Petroquímica em Reatores em batelada com biomassa dispersa e imobilizada com *Aspergillus niger* AN 400. II Congresso de Pesquisa e Inovação Norte e Nordeste de Educação Tecnológica – João Pessoa PB (2007).
6. FARIAS, S. L. Degradação de Benzeno em reatores em batelada com e sem agitação inoculados com *Aspergillus niger* AN400. Fortaleza 2008. Trabalho de conclusão de curso Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará 2008.
7. FELIX J.P.L et al. Remoção de DQO e Fenóis totais presentes em efluentes de indústria petrolífera utilizando reatores de leito fixo e fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* AN 400. In: Kato, M. T. (org.). Gestão e Tratamento de Resíduos (2006).
8. PEREIRA NETO, A. D. et al. Avaliação de contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitratos (NHPAS): uma revisão metodológica. Química Nova, v.3, n. 6, 2000.
9. PINHEIRO B. Z.; PINHEIRO, D. E.; SILVA, M. M. G. RODRIGUES. K.; SAMPAIO S. M. M. G. Degradação de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelada. II Congresso de Pesquisa e Inovação Norte e Nordeste de Educação Tecnológica – João Pessoa PB (2007).
10. TRABUSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMTERTZ, O. S.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. São Paulo. Editora Ateneu, 3ed. 588p. 1999
11. WANDERLEY, P. R. C. *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo de reatores em batelada para remoção do corante vermelho do congo em meio aquoso sintético. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará). Fortaleza (2007).
12. WHELLER, K.A. et al. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicilium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology. N. 12. p. 141-150. 1991.