

II-482 - AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS DERIVADOS DE PETRÓLEO COM FUNGO EM REATOR DE LEITO SUBMERSO

Almiro dos Santos Albuquerque Junior ⁽¹⁾

Tecnólogo em Processos Químicos pelo Instituto Federal do Amazonas – IFAM. Graduando em Arqueologia e Preservação Patrimonial pela Universidade Federal do vale do São Francisco UNIVASF/Campus-Serra da Capivara

Libertalamar Bilhalva Saraiva ⁽²⁾

Graduada em Eng. Química pela FURG (1980), Mestrado em Engenharia de Alimentos, FURG (2000). Doutorado em Eng. Química, UFRN (2007), Professora de Tecnologia em Tratamentos de Resíduos, Estudo das Águas Industriais e Operações Unitárias no IFAM-AM

Sônia Maria de Melo Lima ⁽³⁾

Graduada em Ciências – Universidade Federal de Juiz de Fora (1975) com Habilitação em Biologia; Mestrado em Desenvolvimento Regional – Universidade Federal do Amazonas (2004). Doutorado em Biotecnologia na UFAM (2011). Professora de Biologia e Microbiologia no IFAM.

Endereço ⁽¹⁾: RUA: João Ferreira dos Santos. S/N – Bairro: Campestre – Cidade: São Raimundo Nonato – Estado: Piauí – CEP: 64770-000 – País: Brasil – Tel: (89) 3582 9759 – UNIVASF – almiroalbuquerque@gmail.com

RESUMO

Os compostos os BTX (Benzeno, Tolueno e xileno) necessitam atenção especial em virtude de sua ação impactante no ambiente e dos riscos para a saúde pública, pois o benzeno é comprovadamente carcinogênico enquanto o tolueno e o xileno possuem natureza tóxica. Devido à necessidade cada vez maior de preservar os recursos naturais e consequentemente o homem, buscam-se tecnologias que minimizem os impactos causados pela presença desses compostos no meio. Dentro desse contexto, o uso de fungos e reatores visando o tratamento dos mais diferentes tipos de águas residuárias vem crescendo e despontando como uma nova tecnologia de biotratamento. Outra vantagem na utilização dos fungos, é que, os mesmos têm a capacidade de suportar possíveis choques na concentração de carga orgânica e hidráulica às quais são submetidos, e são tolerantes a variações de escassez de umidade, oxigênio e nutrientes, por isso as vantagens do emprego de fungos como inóculo de reatores biológicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o melhor meio de cultura para o cultivo do fungo *Aspergillus niger*. E estudar também, a fonte de carbono indutor mais adequado para estimular o crescimento e metabolismo do fungo e induzir o mesmo, na degradação dos compostos tóxicos contidos na gasolina, os compostos BTX, em reator de batelada. O reator foi operado por 60 dias com tempo retenção hidráulico (TRH) de cinco dias, atingindo 72,36% de eficiência de remoção medindo DQO. Os resultados mostram que o *Aspergillus niger* pode ser utilizado na degradação de compostos aromáticos derivados do petróleo como o BTX.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger*, BTX, Degradação, Reator em batelada.

INTRODUÇÃO

Segundo o Anuário Estatístico da Agência Nacional de Petróleo de 2009, o Brasil possui 36.720 postos de combustíveis, muito destes operando em condições de risco, com tanques de armazenamento subterrâneos muito antigos, o que pode resultar em grande impacto para o meio ambiente e ao homem quando da ocorrência de derramamento de combustíveis. Tal problema reside na composição destes combustíveis, pois contém alcanos de cadeia linear, cicloalcanos, alguns íons metálicos, compostos nitrogenados e, principalmente, hidrocarbonetos aromáticos, como os compostos BTX, designação para o benzeno, tolueno, e xileno. (TRIBURTIUS *et al.*, 2005).

Os compostos BTX necessitam atenção especial em virtude de sua ação impactante no ambiente e dos riscos para a saúde pública, pois o benzeno é comprovadamente carcinogênico enquanto o tolueno e o xileno possuem natureza tóxica.

Devido à necessidade cada vez maior de preservar os nossos recursos naturais e consequentemente o homem, buscam-se tecnologias que minimizem os impactos causados pela presença desses compostos no meio. Dentro desse contexto, o uso de fungos e reatores visando o tratamento dos mais diferentes tipos de águas residuárias vem crescendo e despontando como uma nova tecnologia de biotratamento (SAMPAIO *et al.* 2004).

O conhecimento sobre a fisiologia e o metabolismo dos fungos é de suma importância para a fundamentação e otimização de processos envolvendo sua aplicação em reatores, seja na fermentação industrial – para obtenção dos mais diferentes produtos, como antibióticos, vitaminas, bebidas, conservantes, entre outros – ou a biorremediação de poluentes.

No caso específico do tratamento de águas residuárias industriais que apresentam comumente em sua composição gama variada de compostos xenobióticos recalcitrantes, muitos destes detentores de elevado grau de toxicidade e de ação deletéria ao ambiente e ao homem. O controle de inconvenientes observados na operação de reatores, como crescimento excessivo, limitação difusional de substrato e consequente perda de eficiência, exige o domínio da indução de fungos, no sentido de lhes proporcionar condições para que os mesmos possam utilizar o poluente como substrato, resultando em uma tecnologia com nível elevado de eficiência e segurança, a fim de os reatores com inóculo fúngico se firme como sistemas confiáveis e economicamente viáveis (RODRIGUES, 2012).

Diante da problemática apresentada, este trabalho teve como objetivo, a utilização do fungo *Aspergillus niger*, para a avaliação da biodegradação de compostos fenólicos (BTX). Com efluente sintético contendo gasolina, induzidos pela presença da glicose e determinados pelo parâmetro da DQO em reator de leito submerso em batelada.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Controle Ambiental, Micologia, Biologia e Microbiologia da Gerência Educacional de Química e Meio ambiente no Campus Manaus Centro do IFAM. E foi dividido em duas etapas experimentais, sendo que, nas duas etapas foi utilizado o parâmetro Demanda Química de Oxigênio (DQO) como controle da degradação biológica. A metodologia analítica seguiu o Standard Method for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

PRIMEIRA ETAPA: ESCOLHA DO MEIO DE CULTURA E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

Foi utilizado o microrganismo *Aspergillus niger*. A cepa está disponível no acervo do IFAM. Foram preparados dois meios: Agar batata (A.B) e Agar sabourand (A.S) 4%.

Para diluição e preparação do nutriente usou-se 7,8g do A.B e 13g do A.S para preparar 200 mL de cada solução. Em seguida esterilizou-se na autoclave em 121°C por 15 minutos. Com as placas previamente esterilizadas, adicionou-se mais 20 mL de Agar Potato em três placas petri e em outras três placas mais 20 mL de Agar Sabouraud. Inoculou-se nas placas o microrganismo e inoculou-se 7 (sete) dias para o crescimento do mesmo. Após esse período, observou-se o melhor nutriente (que no caso em questão foi o Agar Potato). Para o cultivo dos esporos para preparo da solução, fez-se um novo repique em tubos inclinados, o nutriente ficou posicionado em forma de rampa para melhor inoculação do microrganismo e para o volume e quantidade certa da solução contendo os microrganismos que foi na proporção de 2×10^6 , de esporos em suspensão. Conforme as figuras 1 e 2:



Figura 1: Tubos de ensaio contendo Agar potato Dextrose, sem os fungos



Figura 2: Tubos de ensaio com fungos, após sete dias de inoculação

Foram realizadas avaliações da melhor fonte de carbono primário, (glicose, sacarose e frutose), com fungos *Aspergillus niger* pelo melhor desempenho do fungo na biodegradação de BTX com os substratos citados.

A avaliação foi feita através do parâmetro de análise DQO, que permitiu medir indiretamente a quantidade de matéria orgânica a partir da quantificação da demanda de oxigênio necessária para oxidá-la.

Montagem e Funcionamento dos Reatores em Batelada

Foram utilizados 12 erlenmeyers de 250 mL, previamente estéreis, para montagem dos reatores, sendo três do tipo controle (branco), cada um contendo um substrato diferente, outros três contendo glicose, três com sacarose e três com a frutose. Todos em triplicata, divididos segundo suas quantidades pré-estabelecidas para o estudo em questão, sendo: 50mg/L de glicose, 50mg/L sacarose e 150mg/L de frutose.

Primeiramente, cada reator foi preenchido com 250mL de efluente base. Em seguida, foram adicionadas as respectivas concentrações dos substratos nos reatores. E logo após foi adicionado o inoculo na concentração de 2×10^6 e contendo 2,5mL da solução de esporos do fungo. Em seguida, os 12 erlenmeyers já previamente prontos, foram colocados na incubadora shaker SL 223, com temperatura 30°C e uma rotação por minuto de 150 rpm. Conforme as figuras 3 e 4:



Figura 3: Incubadora Shaker utilizada no experimento



Figura 4: Disposição dos reatores na incubadora shaker, durante o período de execução do experimento

Os reatores permaneceram durante 14 dias, sendo que, no sétimo dia de incubação foi realizada a primeira análise para verificar o melhor substrato, sendo analisada a potencialidade de cada um, perante o fungo, usando o parâmetro DQO. No decimo quarto dia foi feita a ultima analise.

RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

Em relação ao tempo de cultivo e a produção de esporos, a partir da observação da morfologia do crescimento dos fungos em placas de Petri. O meio de cultura com maior eficiência para a inoculação do microrganismo *Aspergillus niger* foi o Agar batata (A.S). Avaliou-se a DQO nos reatores controle para verificar a ação degradadora do fungo medindo DQO.

Nos reatores contendo glicose, houve uma eficiência de remoção de 30,52% nos 14 dias correntes, sendo verificado com a diferença entre o bruto (inicial). Já nos reatores contendo sacarose e restos de frutas (frutose) houve uma eficiência de remoção de 21,56% e 30,70% respectivamente. Entretanto, podemos considerar essa baixa eficiência da sacarose, por envolver a conversão extracelular ou intracelular a hexoses por enzimas invertases. As hexoses são, posteriormente, convertidas intracelularmente a glicose-6-fosfato mediante enzimas da glicólise. Conforme a tabela 1:

Tabela 1: Resultados obtidos na etapa I

Fonte de carbono indutor	DQO (ppm)	DQO (ppm)	DQO dias (ppm)	Média (ppm)	Eficiência de remoção (%)
	Afluente	7 dias	14 dias		
Glicose	398,61	358,69	276,95	317,82	30,52
Sacarose	409,70	335,58	321,34	328,46	21,56
Frutose	454,59	338,51	314,98	326,74	30,70

É importante ressaltar que a glicose ao ser adicionada no meio aumentou a concentração de matéria orgânica, o que ficou refletido no aumento da DQO afluente em relação à água residuária bruta. Porém, a adição de glicose não impede a remoção do poluente se estiver em concentração adequada, pelo contrário, favorece a remoção do mesmo, pois é importante a presença de fonte de carbono de rápida assimilação na síntese enzimática (SINGH, 2006).

Avaliando os reatores contendo restos de frutas (frutose), tendo uma eficiência de remoção, podemos observar que essa eficiência se dar por, além de conter polissacarídeos, há outros nutrientes que a fruta fornece quando utilizada e por isso pode maximizar os resultados.

SEGUNDA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE CONTENDO GASOLINA

O resíduo utilizado foi produzido em laboratório nas proporções das perdas de combustíveis em postos de gasolina, já que o resíduo real não foi possível ser coletado, onde foi realizada a medição de DQO. A Metodologia Analítica seguiu o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

O preparo do efluente semi-sintético foi realizado no Laboratório de Controle Ambiental do IFAM, Campus Manaus Centro, com concentração baseada em Silva 2002, conforme Tabela 2. Onde se utilizou uma concentração de 3% de gasolina e 1% de etanol simulando um efluente de posto de gasolina.

Em um período de 120 horas (5 dias) retirava-se 2L do efluente e ajustava-se o pH 4 ± 5 com ácido clorídrico e a glicose era adicionada numa porção de 50 mg/L. Foram feitas as análises em um período de 60 dias, com as mesmas condições e concentrações iniciais, para facilitar a observação da degradação nesse período de tempo.

Tabela 2: Composição e concentração do efluente base sintético

Reagente	Concentração mg/L	Função
NH ₄ Cl	76,1	Base Silva (2002)
NaCl	10,1	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	46,2	
NaHCO ₃	162,2	
MgSO ₄ .7H ₂ O	16,7	
ZnSO ₄	0,2	
MnSO ₄ .H ₂ O	0,2	
KCl	4,7	
CuSO ₄	0,2	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,2	
Gasolina	3%	Contaminante
Etanol	1%	
Clorofórmio	1%	Controle Microbiológico
Glicose	50	Fonte de carbono indutor

Operações do reator

No projeto anterior do grupo, foi construído um reator em batelada que foi utilizado neste projeto. Este reator com leito submerso é constituído de tubo acrílico de 100 mm de diâmetro, 500 mm de altura, 3 m de espessura, com volume útil de 3,7 L (figura 5).

Foi controlado utilizando o software livre Kemo Relais Timer (Figura 5) por porta paralela (é uma interface de comunicação utilizada para enviar e receber dados entre o computador e um periférico), sistemas de placa de circuito com leds e cabo conector instalados em um computador. O reator foi protegido com insulfilme para evitar fotodegradação dos compostos fenólicos.



Figura 5: Reator; Software Kemo Relais Timer.

Inoculação do microrganismo

O microrganismo escolhido foi a espécie *Aspergillus niger*, por já ter sido empregado com êxito na remoção de efluentes contendo fenol e seus compostos e por haver cepas disponíveis no acervo do IFAM. Onde essas cepas foram cultivadas no laboratório de Microbiologia do IFAM- CMC, retiradas do solo Amazônico. Elas foram cultivadas em meio sólido Ágar Batata, a temperatura de 28°C, durante 7 dias em tubos inclinados, para então serem utilizados como fonte de esporos, no reator. Os esporos de *Aspergillus niger* foram suspensos em água destilada esterilizada, onde esta foi ajustada para 2×10^6 esporos/mL para ser inoculada no reator.

Controle Operacional

O reator foi operado em batelada com leito submerso, tempo de detenção hidráulica de 5 dias, com vazão de 2L e com ajuste de pH entre 4 e 5, valores ótimos para os microrganismos. A temperatura ambiente foi mantida $28 \pm 2^\circ\text{C}$. O oxigênio dissolvido dentro do reator foi mantido em 6mg/L por meio de compressor tipo aquário.

Os parâmetros foram avaliados da variação de concentração de Demanda Química de Oxigênio (DQO) no afluente e no efluente.

Análise de Fósforo

Para análise de fósforo, foi utilizada a Solução de molibdato ácido de amônia; Solução de cloreto estanhoso 2,5%; Solução de ácido forte.

A curva padrão foi previamente elaborada, para as devidas leituras da amostra. Foram utilizados balões volumétricos de 100 mL, com o mesmo volume da amostra, medidos em triplicata. Adicionaram-se duas gotas de fenolftaleína, se a amostra se tornar rósea, adicionar um volume da solução de ácido forte, até torna-lo incolor. Foi acrescentado 1 mL da solução de ácido forte, 4 mL da solução de molibdato de amônio e 10 gotas da solução de cloreto estanhoso. Agitou-se o recipiente.

Aguardou-se por 10 minutos e em seguida mediu-se a absorbância e a concentração no espectrofotômetro UV/visível em um comprimento de onda de 690nm. A análise seguiu a Metodologia do Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater (APHA, 1998).

RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

O reator foi operado por 60 dias, sendo alimentado com 2L de afluente a cada 5 dias, avaliando-se a matéria orgânica pela análise de DQO, para observar a eficiência de remoção da matéria orgânica. Observou-se também a formação de material orgânico filamentosos e grande adaptabilidade do fungo. Isto comprova que as espécies utilizadas no experimento conseguem sobreviver e degradar os resíduos avaliados.

Durante todo o experimento o afluente foi ajustado para o pH entre 3 a 4. Estes valores são considerados ótimos para o desenvolvimento do fungo. Esse pH foi ajustado com ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio. O pH do efluente foi medido, e ficava em torno de 2 a 3.

A variação de pH é analisada para observar a atividade metabólica do fungo. O pH de uma cultura pode variar em razão do microrganismo e de seu comportamento metabólico, assim como também a natureza do substrato. Pelos resultados mostrados na figura 7 pode-se observar que a aclimação dos microrganismos ao resíduo líquido foi de 120 horas (05 dias). Observou-se também que o fungo *Aspergillus niger*, adaptou-se muito bem com a concentração de 3% de gasolina.

A partir daí observou-se, primeiro ao trigésimo dia, média de remoção de 53,6%. E uma remoção chegando a degradar em cinquenta dias 72,3% (Figura 6 e 7).

FARIAS *et.al* (2012), Obteve um crescimento gradativo de degradação com compostos BTX, atingindo em sessenta dias 43% de eficiência de remoção com tempo de remoção hidráulica de quatro dias. Utilizando *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp* com reatores em batelada.

GARCIA, VENCESLADA E PEÑA (1997) alcançaram com o uso de *Aspergillus terreus* o percentual de 94% de remoção de fenol, e Rodrigues (2006) que utilizou reatores de fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* o percentual de 100% de remoção de fenol.

Segundo NARDI *et al.* (2005) utilizaram *Aspergillus niger* em reatores anaeróbios para tratar água contaminada com gasolina e acompanhar o decaimento de DQO e BTX. A água sintética do primeiro reator era composta de gasolina solubilizada em etanol, proteínas e carboidratos e, no segundo reator, foi usada uma mistura de gasolina comercial e água. Os autores alcançaram excelentes remoções de DQO, de 96% no primeiro reator, e de 99%, no segundo.

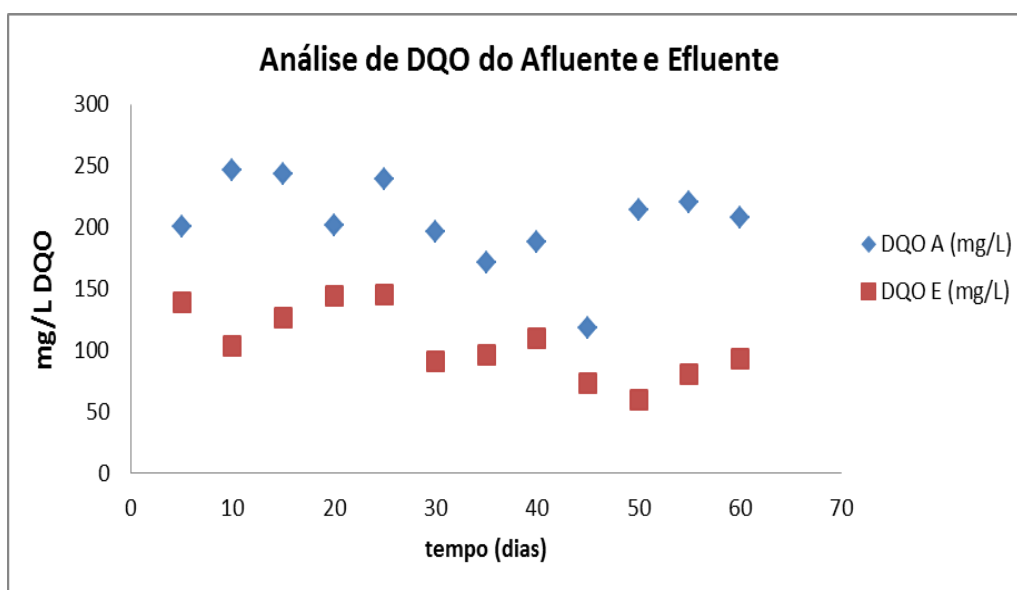


Figura 6: Resultados do Afluentes e Efluentes medidos em DQO

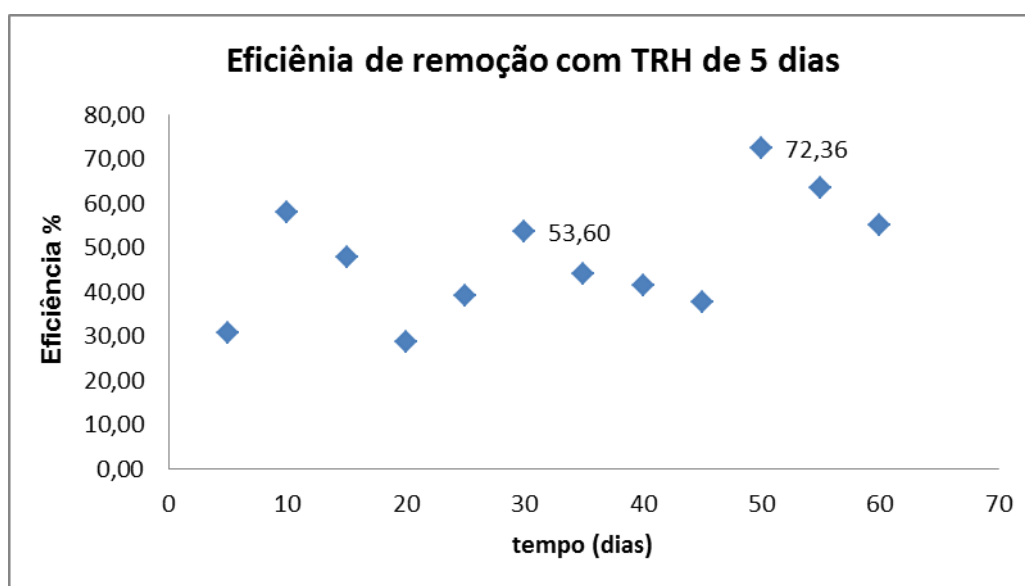


Figura 7: Eficiência de remoção

Foi analisado fosfato no afluente e efluente da água residuária contendo gasolina, e a eficiência de remoção de 52.17% indica um acúmulo de fosforo no meio analisado, evidenciando que o fungo, em sua grande maioria, não o utilizou em seu metabolismo.

Sabe-se que o ortofosfato é a forma diretamente assimilada pelos fungos, existindo relatos de que mecanismos de assimilação destes nutrientes possuem estreita relação com o nível do oxigênio no meio e com o pH, sendo este afetado pela produção de ácidos orgânicos e pela assimilação de nitrogênio amoniacal (GRIFFIN, 1994).

As médias da remoção de ortofosfato e de fósforo total, obtidas no final dos ciclos em estudo, foram, respectivamente, de 60 e 49% e não foi observado acúmulo de fósforo no meio, como ocorreu na etapa anterior. O acúmulo de fósforo no meio pode indicar que o mesmo não foi, em grande parte, utilizado pelo metabolismo microbiano, mas apenas armazenado nos vacúolos na forma de fosfatos e polifosfatos como compostos de reserva e, posteriormente, liberados em função do metabolismo celular, (KORNEBERG; RAO; AULT-RICHE, 1999; LI; ZHAO; YUAN, 2005).

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Considerando os resultados obtidos pode-se inferir que a espécie *Aspergillus niger* apresentou capacidade para remoção dos compostos aromáticos (BTX) presentes na gasolina em água residuária sintética com adição de glicose como fonte primária de carbono, alcançando valores de remoção em torno de 72,36% para um tempo de detenção hidráulico de cinco dias.

Os resultados mostram que a remoção de compostos aromáticos (BTX) é viável em reator em batelada, devendo ainda ser estudadas concentrações maiores de gasolina, TDH menores ou maiores, outras fontes de carbono como indutor e estudos sobre a matéria orgânica em filamentos.

AGRADECIMENTOS

A FAPEAM pelo apoio financeiro ao Projeto de Iniciação Científica, agradecemos ainda, o contínuo apoio do IFAM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AINSWORTH, G. C; SUSSMAN, A. S. The fungi: an advanced treatise. Londor. Academic Press. V.1, 426p, 1966.
2. FARIAS.T. et al: Utilização de Fungos na Degradação de Compostos Fenólicos Derivados de Petróleo. 7º Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e inovação. Palmas-TO. 2012.
3. GRIFFIN,D. Fungal Physiology. New York: Wiley Liss, 1994.
4. KORNEBERG, A.; RAO, N.N.; AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu Rev Biochem, v. 125, p. 68-89, 1999
5. MACIEL,G.M. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço da cana de açúcar e farelo de soja. 2006, 88f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2006
6. MANFIO, G. P.; GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; Biorremediação. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 34, p. 36-43, janeiro/ junho, 2005.
7. NARDI, I. R. DE; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. Process Biochemistry, v 40, p.587 – 592, 2005.
8. RODRIGUES, K.; MARINHO, G. Fungos e águas residuárias industriais. Coordenação Laboratório de Tecnologia Ambiental do IFCE. – Recife : Imprima, 199p. 2012.
9. SAMPAIO, G. M. M.S. *et al* . Pós-tratamentode Efluentes de um Reator UASB Através de um Reator Biológico com Fungos. Associação Brasileira de Engenharia Sanitaria e Ambiental. V.9, n1, p 73-81 .(2004)
10. TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E. S. Degradação de btxs via processos oxidativos avançados. Química Nova, v. 28, n. 1, p. 61 – 64, 2005.