

## **Remoção de Benzeno e Matéria Orgânica Carbonácea de Matriz Aquosa por *Aspergillus niger* AN400 em Reatores em Batelada**

**Zuleika PINHEIRO<sup>(1)</sup>; Eloiza DAMASCENO<sup>(2)</sup>; Germana MARINHO<sup>(3)</sup>; Kelly RODRIGUES<sup>(4)</sup>; Glória MARINHO<sup>(5)</sup>**

(1) Centro Federal de educação Tecnológica do Ceará, Rua Martinho Rodrigues nº 1301 Apto 903 Fátima, Fortaleza - CE, 32471264, e-mail: [zuleikabpinheiro@bol.com.br](mailto:zuleikabpinheiro@bol.com.br)

(2) Centro Federal de educação Tecnológica do Ceará, e-mail: [eloizapd@hotmail.com](mailto:eloizapd@hotmail.com)

(3) Centro Federal de educação Tecnológica do Ceará, e-mail: [germana@cefetce.br](mailto:germana@cefetce.br)

(4) Centro Federal de educação Tecnológica do Ceará, e-mail: [kelly@cefetce.br](mailto:kelly@cefetce.br)

(5) Centro Federal de educação Tecnológica do Ceará, email: [gloriamarinho@cefetce.br](mailto:gloriamarinho@cefetce.br)

### **RESUMO**

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. A fim de avaliar a biodegradação desses composto, este 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 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 quatro 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) e 50% de remoção de benzeno nos reatores (RFG) e 40% nos reatores (RF). Portanto, os resultados deste estudo demonstraram a capacidade de degradação do *Aspergillus niger* AN 400 frente a matéria orgânica carbonácea e benzeno em concentrações de benzeno de até 10%.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger* AN 400, benzeno, reatores em batelada

## 1. Introdução

O petróleo e seus derivados contém uma complexa mistura de hidrocarbonetos que podem ser caracterizados simplificada em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltanos, 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 seu 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 freqüentes das regiões do Brasil pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Rhodotorula*, *Cândida*, *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 teve como principal objetivo empregar o tratamento biológico para remoção/degradação de benzeno presentes em água residuária sintética em diferentes concentrações.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 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 (SAMPAIO, 2005).

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.

## 2.2 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 40 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.

## 2.3 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 benzeno nas seguintes concentrações: 10%, 5% e 1%.

## 2.4 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 3 M.

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 quatro dias, para a determinação das variáveis.

## 2.5 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 (HPLC Gilson mod. 321, equipado com detector UV-VIS), coluna Varian Microsorb – MV 100-5 C18 250 x 4.6mm, sistema isocrático com fase móvel metanol/água (70:30 v/v),  $\lambda = 260$  nm,  $Q = 0.075$  mL/min e volume de injeção de 50 µL.

## 3. Resultados

### 3.1 Variação do 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 nas Figuras 1, 2 e 3, nas concentrações 10%, 5% e 1%, respectivamente.

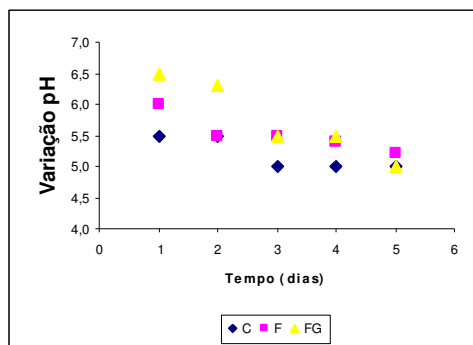


Figura 1– Variação do pH em reatores com concentração de benzeno de 10%

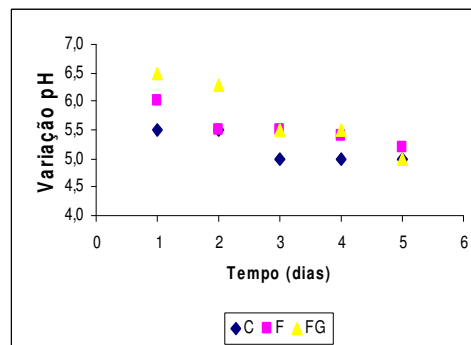
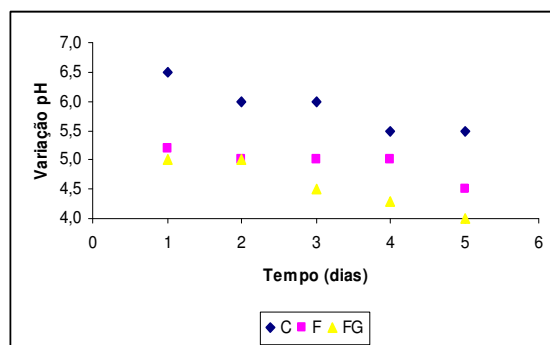


Figura 2– Variação do pH em reatores com concentração de benzeno de 5%



**Figura 3**– Variação do pH em reatores com concentração de benzeno de 1%

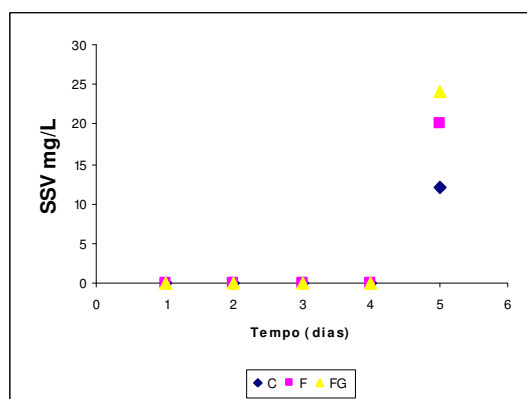
Segundo Wheller et al. (1991) o gênero *Aspergillus niger* desenvolve-se bem em faixas de pH variando entre 3,30 e 7,50, como verificado nesta pesquisa. Em outras pesquisas, como nas de Oliveira et al. (2006) e de Félix et al. (2006), o pH foi ajustado artificialmente no início do experimento, a uma 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. Os reatores RF e RFG, apresentaram diminuição do valor de pH, em todas as concentrações testadas, possivelmente em função dos fungos que, ao degradar os compostos contidos na água produzem ácidos. A produção significativa de ácidos orgânicos pelos fungos depende das condições do meio, as quais variam dependendo do ácido envolvido. As principais variáveis que

exercem influência sobre a produção dos ácidos orgânicos são o pH do meio, aeração adequada e presença de uma fonte de carbono de assimilação rápida que deve estar presente em concentração elevada (RODRIGUES 2006). Houve também uma diminuição do pH nos reatores de controle, possivelmente esses reatores foram contaminados por outros microrganismos.

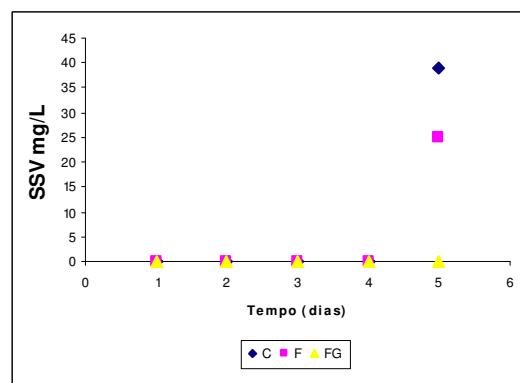
### 3.2 Variação de SSV (Sólidos Suspensos Voláteis)

Nos reatores com concentração de 10% de benzeno, houve um crescimento de SSV de aproximadamente 24% nos reatores FG, 20% nos reatores F. Nos reatores com concentração de 5% de benzeno o crescimento da biomassa foi de aproximadamente 25% nos reatores F, porém nos reatores FG não houve crescimento da biomassa, porém na concentração de 1% de benzeno 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 pela fácil assimilação do fungo a esse co-substrato – glicose.

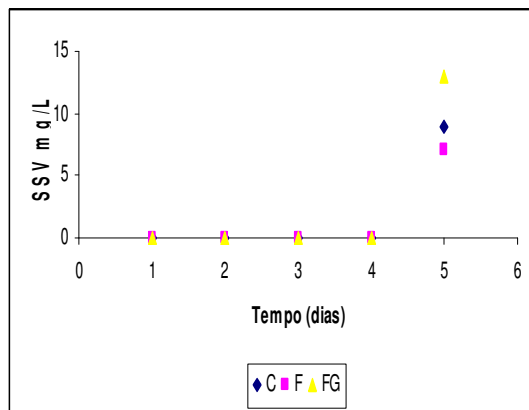
Nas Figuras 4, 5 e 6 são mostradas as variações de SSV nas concentrações de benzeno de 10%, 5% e 1%, respectivamente.



**Figura 4**– Variação de SSV em reatores com concentração de benzeno de 10%



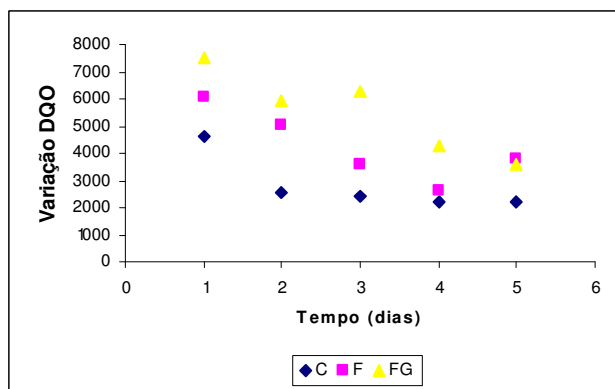
**Figura 5**– Variação de SSV em reatores com concentração de benzeno de 5%



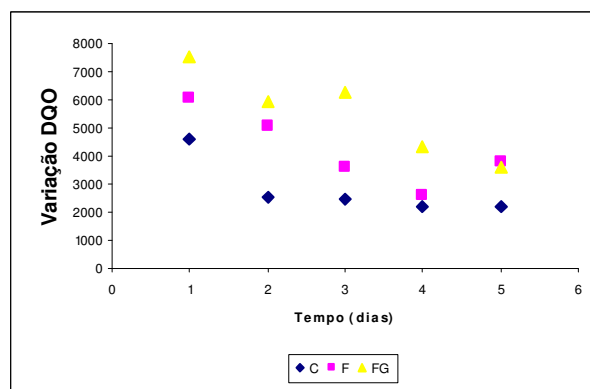
**Figura 6**– Variação de SSV em reatores com concentração de benzeno de 1%

### 3.4 Variação de DQO

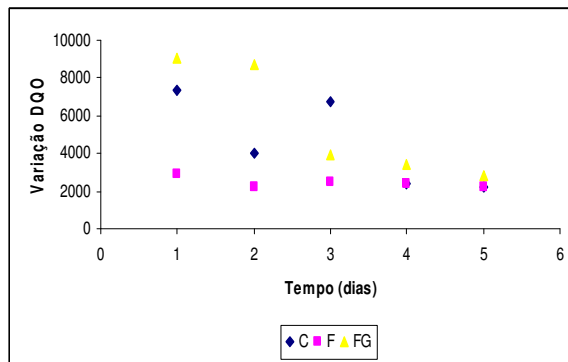
Nos reatores FG houve uma remoção de 52%, 38% e 69% nas concentrações de 10%, 5% e 1% de benzeno, respectivamente. Observou-se que nos reatores de concentração de 1% houve uma maior remoção da matéria orgânica, possivelmente isso ocorreu pelo fato de haver uma baixa carga orgânica e que ao esgotar a 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%, respectivamente. Observou-se que a remoção nos reatores F na concentração de 5% foi maior que nos reatores FG, 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. Rodrigues (2006) relatou que a glicose por ser um composto mais facilmente degradado, resulta em um aumento mais rápido da biomassa, e, conseqüentemente, da eficiência de remoção de matéria orgânica, devido seu maior consumo pela população microbiana. A variação de DQO na concentrações de benzeno de 10%, 5% e 1%, pode ser observada nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.



**Figura 7**– Variação de DQO em reatores com concentração de benzeno de 10%



**Figura 8**– Variação de DQO em reatores com concentração de benzeno de 5%



**Figura 9**– Variação de DQO em reatores com concentração de benzeno de 1%

#### 4. Variação de Benzeno

Os resultados mostraram que ao final do experimento a remoção de benzeno foi de aproximadamente 44%, 26% e 41% nos reatores com fungo em concentrações de benzeno de 10%, 5% e 1% respectivamente e 51%, 54% e 42% nos reatores com fungo e glicose nas concentrações de 10%, 5% e 1% de benzeno respectivamente. Houve remoção de aproximadamente 19%, 38% e 27% para as concentrações de benzeno de 10%, 5% e 1%, respectivamente, nos reatores de controle, possivelmente os mesmos foram contaminados por outros microrganismo ocasionando assim a remoção desse composto. Farias 2007, ao trabalhar com benzeno na concentração de 100 mg/L sob agitação obteve resultados de remoção de 33,4% com 14 dias de operação. Diferente desta pesquisa que alcanço 50% de remoção com quatro dias de operação. Segundo Brito (2005) a alta toxicidade do composto pode estressar o fungo e inibir o seu metabolismo. Nas figuras 10, 11 e 12 são mostradas as variações de benzeno nas concentrações de benzeno de 10%, 5% e 1% respectivamente.

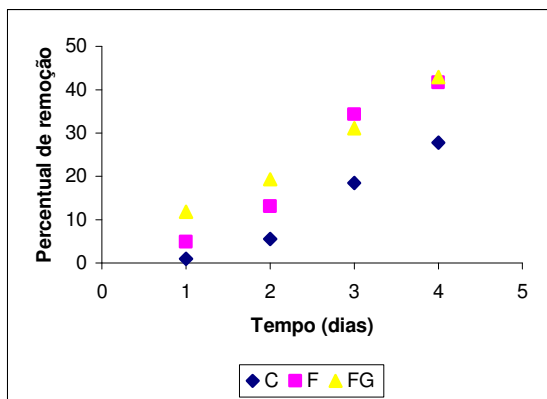


Figura 10– Variação de Benzeno em reatores com concentração de benzeno de 10%

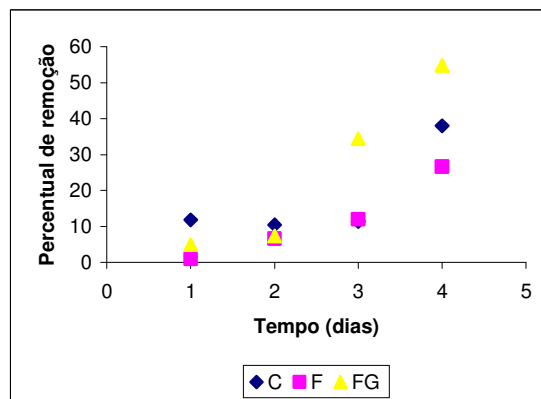


Figura 11– Variação de Benzeno em reatores com concentração de benzeno de 5%

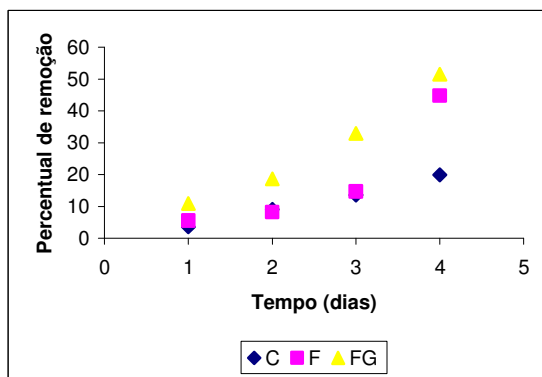


Figura 12– Variação de Benzeno em reatores com concentração de benzeno de 1%

#### 5. Conclusão

Os resultados deste estudo demonstraram a capacidade de degradação de matéria orgânica por *Aspergillus niger* AN 400 com 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.

## 6. Referências Bibliográficas

- APHA – AWWA – WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater 19<sup>th</sup>, Washington DC, USA, 1999
- 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.
- BITTON, GABRIEL. **Wastewater microbiology**. New York, 17-19p. 1994.
- 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.
- BRITO, F. V.; OLIVEIRA, A. S.; NEVES, H. C.; AZEVEDO, J. A. T.; BHERING, D. L.; DOS REIS, S. M.; MACHADO, M. C.S.; AZEVEDO, G. C.; CARVALHAES, G.K. (2005). **Estudo da Contaminação de águas subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil**. 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás.
- 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.
- MARINHO, G. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos**. Tese de doutorado-Escola de engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. 2005. Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo – SP 2005.
- 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.
- RODRIGUES, K. de A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. São Carlos, 2006. Tese de doutorado-Escola de engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. 2006
- TRABUSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMTERTZ, O. S.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo. Editora Ateneu, 3ed. 588p. 1999
- WANDERLEY, P. R. C. (2007). ***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.
- 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.