

# ACÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA REMOÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS (BTX) EM SISTEMA DE REATOR DE BATELADAS SEQUENCIAIS.

**João Paulo SIQUEIRA (1), Isabel Cristina MOREIRA (2), Patrícia CELESTINO (3), Rinaldo ARAÚJO (4), Glória MARINHO (5), Kelly RODRIGUES (6).**

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará [jpsiqueira.ce@gmail.com](mailto:jpsiqueira.ce@gmail.com), (2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará [isabelbelcris@gmail.com](mailto:isabelbelcris@gmail.com), (3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará [patricia.ifce@gmail.com](mailto:patricia.ifce@gmail.com), (4) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará [rinaldo@ifce.edu.br](mailto:rinaldo@ifce.edu.br), (5) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará [gloriamarinho@ifce.edu.br](mailto:gloriamarinho@ifce.edu.br), (6) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará [kelly@ifce.edu.br](mailto:kelly@ifce.edu.br)

## RESUMO

Os BTX (benzeno, tolueno e xileno) são compostos aromáticos presentes em combustíveis derivados do petróleo, com obtenção a partir do refino do petróleo bruto e podem entrar em contato com o meio mediante vazamentos de tubulações e tanques de armazenamento de combustíveis, resultando em danos ao ambiente e a saúde pública. O benzeno é considerado o mais tóxico, fato este que está relacionado diretamente ao seu potencial carcinogênico e mutagênico. Como alternativa de tratamento desses compostos aromáticos esta pesquisa utiliza reatores em batelada com inóculos fúngicos para remoção de BTX em meio aquoso. Na Etapa 1 foi inoculada a espécie *Aspergillus niger* AN400 em meio suporte em reator com volume reacional de 4 L em tempo reacional de 48 h por 12 ciclos. A remoção de BTX atingiu bom nível de eficiência, apresentando percentuais médios de 60%, 96% e 50% para benzeno, tolueno e xileno, respectivamente. A matéria orgânica quantificada em termos de DQO apresentou remoções de até 91% (ciclo 11) para DQO particulada e 97% (ciclo 12) para DQO solúvel. O pH do meio apresentou-se sempre em faixa ácida com media entre os ciclos de 4,6 e 2,5 para os tempos de 0 h e 48 h, respectivamente. Ao final foi realizada microscopia e foi constatada contaminação do meio por outro fungo filamentoso identificado como *Penicillium* sp.

**Palavras chave:** BTX, fungos filamentosos e reator de batelada sequencial

## INTRODUÇÃO

A forte postura, quase sempre errônea, da industrialização a qualquer preço, somada à urbanização desordenada, principalmente, nos centros urbanos pressiona a capacidade de suporte do meio ambiente, atingindo negativamente os recursos naturais, desfavorecendo o equilíbrio ecológico e comprometendo a qualidade de vida da população. Entre as principais fontes de contaminação de solos e águas subterrâneas, urbanos, podem-se citar os vazamentos em dutos e tanques de armazenamentos subterrâneos de combustível (SILVA *et al.*, 2008), cujo o maior problema da contaminação por gasolina está relacionado com hidrocarbonetos aromáticos, dentre os que se destacam benzeno, tolueno e xilenos (BTX) (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Por outro lado, a contaminação de águas subterrâneas por compostos orgânicos deste tipo representa também sérios problemas à saúde pública (TIBURTIUS *et al.*, 2004). Estes compostos juntos, e também isoladamente, são capazes de induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos, tais como alterações cromossômicas e danos ao DNA, sendo que a mistura BTX (benzeno, tolueno e xileno) parece também exercer efeito acumulativo nas células, o qual é provocado por concentrações fora do padrão aceitável (MAZZEO *et al.*, 2008).

Segundo Cunha (2000) vários métodos podem ser utilizados para remover os compostos BTX presentes na gasolina de águas contaminadas como: *Sparging Air* – processo de injeção de ar diretamente nas águas

subterrâneas –, *pump and treat* – tratamento físico em que a água contaminada por poluentes orgânicos é retirada por bombeamento, submetida a um processo de remoção de poluentes – e a biorremediação.

Tiburtius (2004) relatou que embora eficientes, os processos *Sparging Air* e *pump and treat* apresentam sérias limitações, principalmente relacionadas com o seu caráter não destrutivo. Barbosa (2008) apontou como solução viável e de baixo custo de implementação os tratamentos destas água contaminadas por micro-organismos. A utilização de micro-organismos como agentes de degradação de poluentes, tem alcançando cada vez mais importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando cada vez mais os ecossistemas naturais (LEMOS *et al.*, 2008).

Numerosas pesquisas utilizando processos biológicos com fungos filamentosos tratando águas residuárias industriais contendo compostos tóxicos têm alcançado resultados relevantes, como as de Rodrigues (2006), Mello (2007), Garcia-peña *et al.* (2008).

Vislumbrando à aplicação de tecnologia alternativa na remoção de compostos BTX em meio aquoso, esta pesquisa teve como objetivo a remoção destes compostos recalcitrantes e matéria orgânica através de fungos filamentosos em reator de bateladas sequenciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi operado reator (Figura 2.1.) em regime de batelada repetida com biomassa fúngica imobilizada no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) por 12 ciclos de 48 h cada.



**Figura 2.1:** Reator em batelada sequencial com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN400.

### Água Residuária Sintética

O meio sintético foi preparado com água de torneira e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de glicose, como cossubstrato. Adicionou-se ainda macro e micronutrientes, disponibilizados nas respectivas concentrações: 0,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,25g NaNO<sub>3</sub>, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25g MgSO<sub>4</sub>, 0,01g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,08g CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05g H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,05g MnSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,05g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0,04g ZnSO<sub>4</sub>. As concentrações dos poluentes, benzeno, tolueno e xileno estavam disponíveis em quantidades iguais a: 30 ppm 30 ppm e 15 ppm respectivamente. Para facilitar a solubilização dos compostos na água residuária foi utilizado álcool etílico P.A.

### Inóculo da Biomassa Fúngica

Foi inoculada a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN400 na forma de suspensão de esporos disponível e preservada a temperatura de -10°C. Os esporos foram adicionados, na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, à frascos erlenmeyer de 250 mL, os quais continham cubos de poliuretano com 1 cm de aresta, estando estes acondicionados em redes de polietileno. Os cubos foram imersos em 200 mL de meio de crescimento contendo glicose (5 g.L<sup>-1</sup>) e cloranfenicol (0,10 g.L<sup>-1</sup>).

Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm, em mesa agitadora durante 120 h, de modo que, quando completadas 48 horas, o meio era substituído por um novo. Assim, passadas as 120 h, as redes contendo os cubos e a biomassa já crescida foram transferidas para o reator a fim de iniciar a operação do mesmo.

### Operação do Reator

O reator foi alimentado com 4 L de meio aquoso sintético e os compostos BTX. O ar foi suprido no meio por mini-compressor. A operação do reator foi realizada em 12 ciclos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11 e C12), cada um com duração de 48 horas.

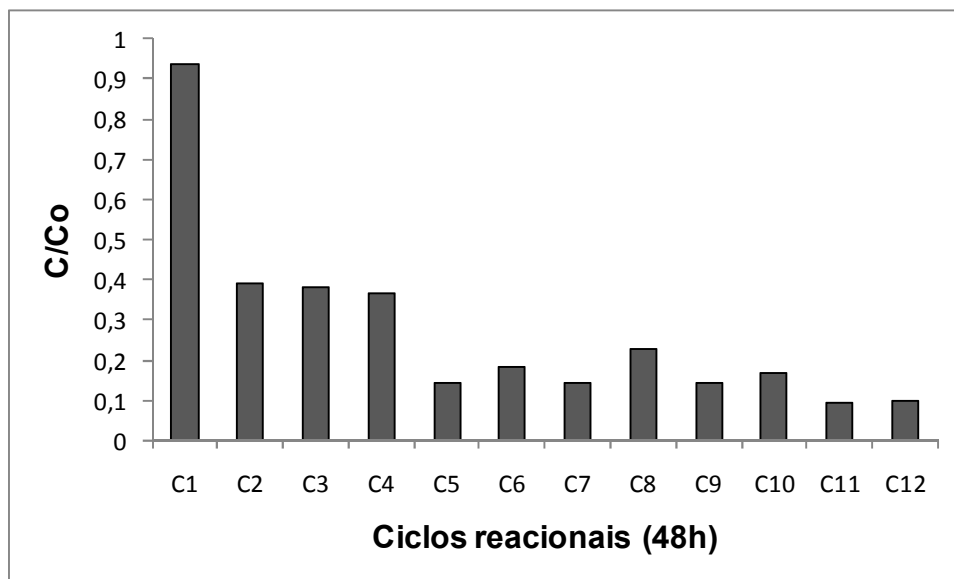
O reator já vinha sendo operado por seis meses antes do início desta Etapa (danos não apresentados) e a alimentação naquele período foi feita com o mesmo meio sintético, excetuando-se a concentração adicionada de glicose (1 e 5 mg.L<sup>-1</sup>) e dos compostos BTX (100 ppm para cada um dos hidrocarbonetos).

Para evitar a possibilidade de fotodegradação dos compostos BTX, o reator foi coberto com sacos pretos de polietileno.

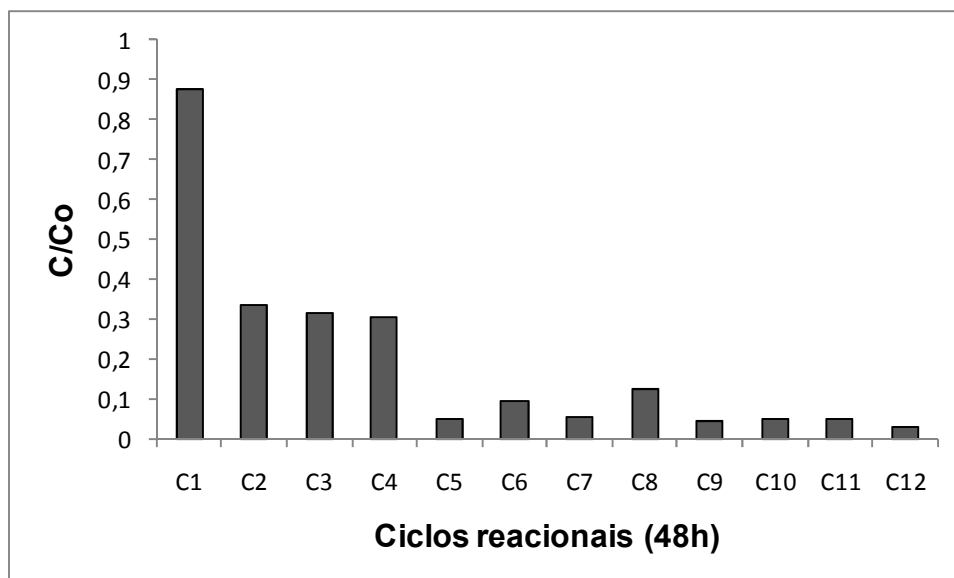
Para a caracterização da água residuária foram analisadas as variáveis: potencial hidrogeniônico (pH), matéria orgânica – DQO particulada e DQO solúvel. Estes parâmetros seguiram metodologia descrita em APHA (2005), exceto BTX que foi detectado através de cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo Clarus 500 (Perkin Elmer) e coluna 30 metros.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações da concentração da matéria orgânica, quantificada através da análise de DQO, estão representadas nas Figuras 3.1 e 3.2 para DQO particulada e DQO solúvel, respectivamente.



**Figura3.1:** Variação da concentração de DQO particulada ao longo dos ciclos operacionais do reator em bateladas sequenciais



**Figura 3.2: Variação da concentração de DQO solúvel ao longo dos ciclos operacionais do reator em bateladas sequenciais**

Os resultados de remoção de DQO particulada e solúvel foram muito relevantes, de modo que a eficiência do sistema se apresentou estável a partir do quinto ciclo, mostrando afinidade dos micro-organismos pelos substratos presentes no meio.

Durante o período de operação dos doze ciclos, o reator, com tempo reacional de 48 h, apresentou 73% de remoção média de DQO particulada, com remoção máxima de 91% (ciclo 11). Quanto à remoção de DQO dissolvida, a eficiência média foi de 80,5% e remoção máxima, no ciclo 12, de 97%.

Verificou-se que ambas as remoções, particulada e solúvel, oscilaram seus valores percentuais, porém houve aumento gradativo da eficiência com o decorrer do experimento. A melhor remoção de DQO solúvel, em comparação a DQO particulada, pode ser explicada pela presença de biomassa fúngica nas alíquotas, a qual não era computada nas análises de DQO solúvel.

Mebirouk *et al.* (2007) estudaram a descoloração e remoção de matéria orgânica (DQO) por processo integrado para tratamento de águas residuárias de fábricas de azeite utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. Inicialmente o efluente sofreu pré-tratamento por floculação-decantação, com auxílio de sulfato de alumínio, o qual permitiu redução dos componentes orgânicos em 30% de DQO. Em seguida o sobrenadante decantado foi direcionado a frascos de 500 mL que também receberam serragem (5 g.L<sup>-1</sup>), sendo agitados em mesa agitadora por 120 h. O uso da serragem possibilitou alcançar remoção de 53% de DQO devido à retenção física de matéria orgânica pela serragem. Posteriormente, o efluente foi destinado a biodegradação pelo *Phanerochaete chrysosporium* em frascos contendo 250 mL de efluente que foram incubados a 37°C, por 12 dias. O *Phanerochaete chrysosporium* removeu 70% de matéria orgânica.

O percentual de remoção de matéria orgânica obtido por Mebirouk *et al.* (2007), de 70%, foi inferior ao registrado neste trabalho para DQO particulada (91%), sendo que aqueles autores alcançaram o percentual mencionado em 7 dias, tempo reacional superior a duração dos ciclos em que o reator em batelada sequencial foi operado (2 dias), sem mencionar o fato de que o efluente utilizado naquela pesquisa sofreu remoção de matéria orgânica pela ação prévia de tratamentos físico-químicos.

As melhores remoções encontradas pela operação do reator em batelada sequencial com inóculo fúngico podem ter sido favorecidas pelo uso de biomassa imobilizada, pois quando os micro-organismos são imobilizados, há aumento da produtividade de síntese dos metabólitos devido a fatores como elevada concentração de células e maior tempo de retenção celular (FREEMAN e LILLY, 1998).

De modo similar à remoção de matéria orgânica, a remoção dos compostos BTX atingiu bom nível de eficiência, registrando-se percentuais médios de 60%, 96% e 50% para benzeno, tolueno e xileno,

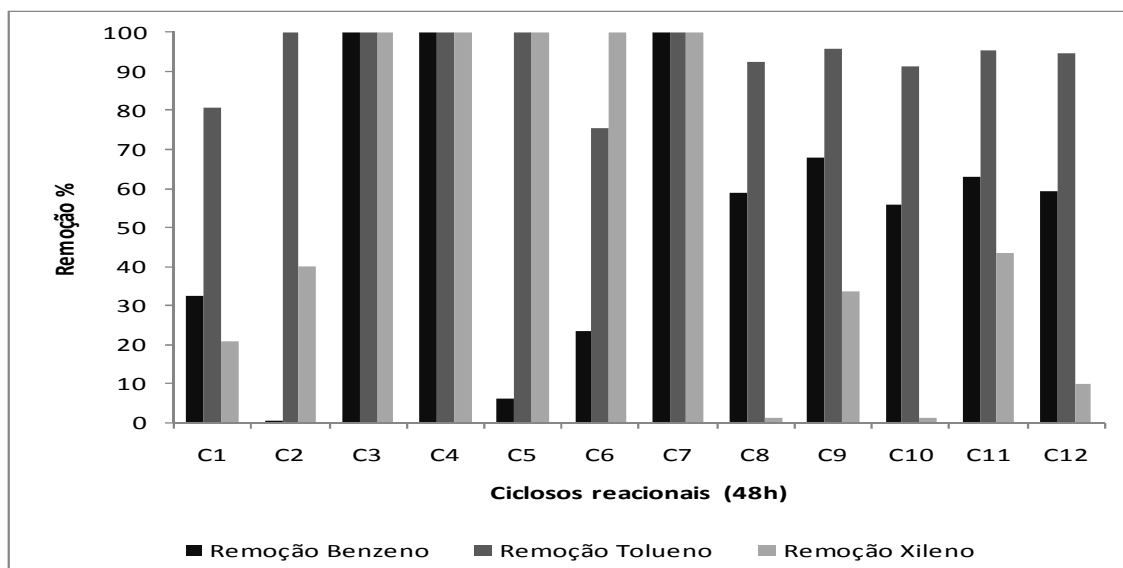
respectivamente. Em face destes resultados, aparentemente, houve maior facilidade pelos micro-organismos em remover o tolueno, seguido do benzeno e do xileno.

Os resultados de remoção dos compostos BTX ao longo da operação do reator estão apresentados na Figura 3.3.

García-Peña *et al.* (2008) ao utilizar inóculo de *Paecilomyces variotii* para tratar água contendo mistura de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, denominados de BTEX, obtiveram degradação inicial de tolueno seguido de etilbenzeno, benzeno e, por último, do xileno. Os autores relataram que, dentre estes compostos, os que são degradados com maior dificuldade, tanto por fungos quanto por bactérias, são o benzeno e as formas de xileno, orto, meta e para-xileno.

Na degradação biológica de hidrocarbonetos aromáticos, os micro-organismos primeiramente oxidam um grupo metil, o que resulta na formação de complexos intermediários para posteriormente continuar a degradação (MALIYEKKAL *et al.*, 2004).

Ainda segundo Maliyekkal *et al.* (2004), pela ausência do grupo metil em benzeno a desestabilização é mais complexa pois a clivagem do anel via ação biológica envolve número maior de reações. Já a biodegradação dos xilenos, o qual possui dois grupos metis, é iniciado pela oxidação um grupo metil primeiro, o que resulta na formação de complexos intermediários. A clivagem do anel se torna mais difícil uma vez que estes compostos intermediários formados são mais tóxicos e inibitórios para a continuação da degradação.



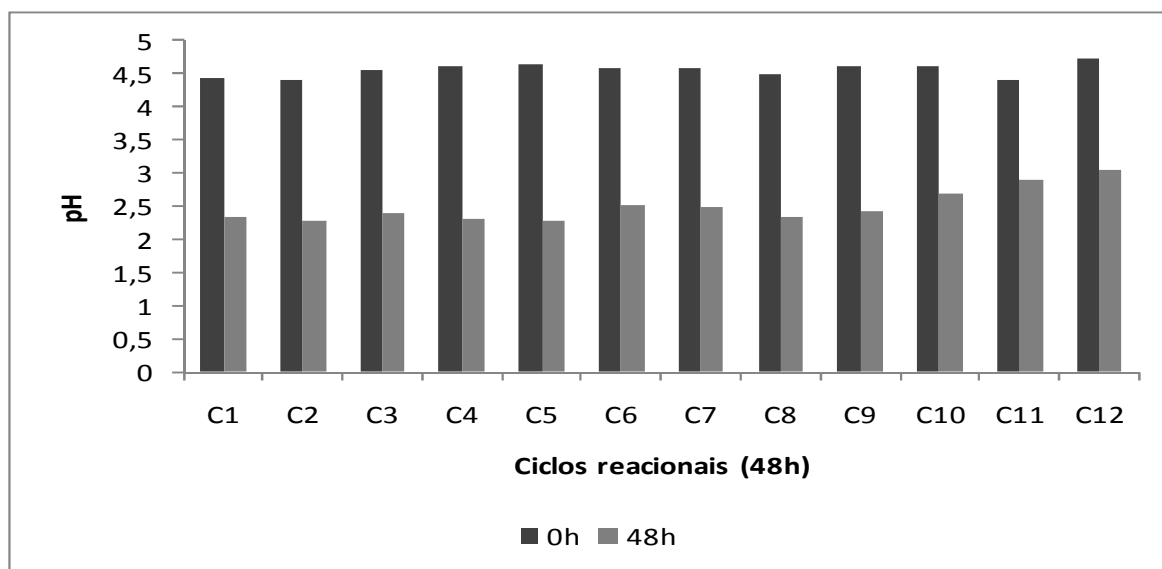
**Figura 3.3: Variação da concentração de BTX ao longo dos ciclos operacionais do reator em bateladas sequenciais.**

Segundo Lemos (2008), na degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos, há a transformação inicial do substrato aromático em um metabólito dihidroxiaromático, geralmente um catecol, o qual sob a ação de *dioxigenases* tem o anel aromático rompido, de modo que, posteriormente, ocorre a produção de intermediários do metabolismo central como acetil-CoA, oxalato e piruvato.

Como resultado final da assimilação destes compostos pelos micro-organismos, são formados os ácidos succínico, fumárico, pirúvico e acético, bem como à de aldeídos, os quais são todos empregados na síntese dos constituintes celulares, gerando, concomitantemente, energia, CO<sub>2</sub> e água, que são produtos dessas reações WILSON e JONES, (1993) *apud* JUHASZ e NAIDU (2000).

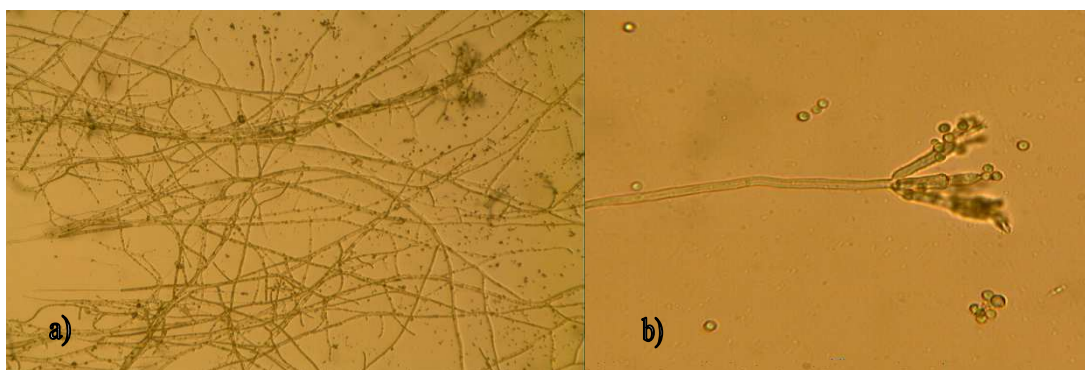
Os fungos em comparação com as bactérias são mais tolerantes ao meio ácido (ESTÉVEZ *et al.*, 2005). Neste trabalho, os valores de pH obtidos para o afluente e efluente dos ciclos operacionais apresentaram-se sempre em faixa ácida (Figura 3.4), sendo os valores médios, respectivamente, de em 4,6 e 2,50, o que favorece o desenvolvimento dos fungos.

A diminuição do pH do efluente, pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos, bem como pelo consumo preferencial de nitrogênio amoniacal em comparação com nitrato (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).



**Figura 3.4: Variação do pH ao longo dos ciclos operacionais do reator em batelada sequencial.**

A análise de microscopia, realizada após o término desta pesquisa, mostrou que houve contaminação do meio por outra espécie de fungo, a qual foi posteriormente identificada como *Penicillium* sp. (Figura 3.5)



**Figura 3.5: a) Conjunto de hifas de *Penicillium* sp. (aumento 100X); b) Fragmento de hifa do *Penicillium* sp. (aumento 400X).**

A diminuição da aeração pode ter influenciado na contaminação do meio pelo *Penicillium* sp., pois devido à problema operacional, o fornecimento de ar ao sistema foi comprometido durante dois dias. Brackmann *et al.* (1996) estudou o efeito das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* e concluiu que as colônias que permaneceram no ar apresentaram menor crescimento. À medida que a concentração do oxigênio diminuiu, o crescimento deste fungo foi estimulado, sendo cessado somente abaixo de 0,2% de oxigênio.

Vários fungos utilizados no controle biológico podem sintetizar diversos metabólitos capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos. Esses metabólitos podem ser de natureza volátil ou não volátil (JUNIOR *et al.*, 2000).

Assim, Junior *et al.* (2000) pesquisaram a inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia Sclerotiorum* por metabólitos produzidos por *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp. Os autores concluíram que *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp. foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno, demonstrando, assim, a produção de metabólitos voláteis que foram prejudiciais ao crescimento micelial.

O meio sintético contendo BTX e nutrientes ofereceu características ótimas para desenvolvimento do *Penicillium* sp. que inibiu o *Aspergillus niger* AN400 e predominou no meio suporte, conforme mostraram as análises microscópicas..

## CONCLUSÕES

Mesmo contaminado com espécie fúngica de gênero diferente (*Penicillium* sp.), a remoção de compostos BTX na Etapa 1 não sofreu alterações negativas que influenciasses na eficiência destes compostos em efluentes sintéticos, o reator obteve remoções relevantes desses compostos, apresentando em alguns ciclos (ciclos 3,4 e7) remoção de 100% em 48 horas dos referentes compostos. A ordem de degradação de BTX no experimento foi de tolueno, seguido por benzeno e xileno.

A remoção de matéria orgânica, na Etapa 1, também apresentou percentuais de remoção significativos de até 90% para DQO particulada (ciclo 11) e 97% para DQO solúvel (ciclo 12), constatando que esta variável apresentou boas remoções, apesar da presença do *Penicillium* sp.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21a. ed. Washington: American Public Health Association. 2005.

BARBOSA, B.C.A. **Biodegradação do corante vermelho do congo em água residuária têxtil sintética por sistema conjugado de filtro anaeróbio seguido de reator biológico com fungos**. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia em Gestão Ambiental, Instituto Federal do Ceará). 70p., Fortaleza, 2008.

BRACKMANN, A., SAQUET, A.A, VEIGA, V. V. **Efeito das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sobre a supressão do crescimento e esporulação de *Penicillium expansum* (link.) Thom, "in vitro"**. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas (em prelo, 1996).

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. . **Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosms**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 31, p. 45-49, 2000.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul. Rio Grande do Sul. 2004.

ESTÉVEZ, E; VEIGA, M.C; KENNES, C. **Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma***. 2005.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. **Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells**. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.

GARCÍA-PEÑA, I., ORTIZ, I., HERNÁNDEZ, S., REVAH, S. **Biofiltration of BTEX by fungus *Paecilomyces variotii***. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 62, p. 442–447, 2008.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R.. **Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene**. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000.

JUNIOR, M. L. ; ABREU, M. S. . **Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e Ph's**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras - MG, v. 24, n. 2, p. 521-526, 2000.

LEMOS, J. L. S. ; OLIVEIRA, S. D. ; BARROS, C. A. ; REICHE, A. P. **Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (haps)**. 2008. (Série Tecnologia Ambiental).

MALIYEKKAL, S. M.; RENE, E. R.; PHILIP, L.; SWAMINATHAN, T. **Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions**. J Hazard Mater, v.109, n.1-3, p.201-11, 2004.

MAZZEO, D. E. C. ; MARIN-MORALES, M. A. . **Avaliação dos Efeitos Genotóxicos e Mutagênicos do BTEX, Utilizando o Sistema Teste de *Allium cepa***. In: III Workshop de Ecotoxicologia, 2008, Rio Claro. Suplemento Especial online da Revista Holos Environment, 2008.

MEBIROUK M., SBAI L., LOPEZ M. and J. GONZALEZ; **The absorption of polyphenols from olive oil mill wastewaters by sawdust and biodegradation by the fungus *Phanerochaete chrysosporium***. *Grasas Y Aceites*, 2007.

MELO, I; GOMES, K; CUNHA LIMA, P; RODRIGUES, K; SAMPAIO, G; **Tratamento de Água Residuária Sintética por *Aspergillus niger* AN400 na Remoção de DQO e Corante Azo**. In: IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica- CONNEPI Belém, 2009.

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.

SILVA, Suzana Pedrosa. **Degradação anaeróbica de BTEX em reatores alimentados com água contaminada com gasolina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil Universidade Federal de Pernambuco- UFPE). Recife, 2008.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. P.; LEAL E. S. **Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados**. Química Nova, v. 27, n.3, p. 441-446, 2004.