



## REMOÇÃO DE BTEX E DE MATÉRIA ORGÂNICA CARBONÁCEA POR FUNGOS EM REATOR DE ESCOAMENTO CONTÍNUO

Sara Fátma Gomes Firmino<sup>1</sup>, Isabel Cristina Moreira<sup>2</sup>, Patricia Celestino Carvalho de Oliveira<sup>3</sup>, Gloria Marinho<sup>4</sup>, Kelly Rodrigues Araújo Pessoa<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduanda em Tecnologia em Gestão Ambiental – IFCE. E-mail: safatimagf@gmail.com

<sup>2</sup> Graduada em Tecnologia em Saneamento Ambiental – IFCE. E-mail: Isabel\_belcris@hotmail.com

<sup>3</sup> Professora do curso de Engenharia Ambiental – IFCE – Campus Quixadá. Mestranda em Gestão Ambiental – IFCE – Campus Quixadá. E-mail: patricia.ifce@gmail.com

<sup>4</sup> Pró-reitora de Pesquisa e Inovação, Professora do Mestrado de Gestão Ambiental e Pesquisadora – IFCE. Doutora em Saneamento Ambiental EESC – USP. e-mail: gloria@ifce.edu.br

<sup>5</sup> Professora do curso de Tecnologia em Gestão Ambiental – IFCE. Doutora em Saneamento pela EESC – USP. Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental. Coordenadora do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM). E-mail: kelly@ifce.edu.br

**Resumo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar a remoção dos compostos tóxicos contidos na gasolina, os compostos BTEX. E observar também a remoção da matéria orgânica. Sobre os compostos do BTEX, foram removidos de forma muito eficiente atingindo ápices de orto-xileno 96,98%, na coleta 11; benzeno 99% e meta-xileno e para-xileno 97%, na coleta 17 e tolueno 98%, na coleta 18. Mas manteve médias de remoção de 93% para benzeno, 95% para tolueno, 94% para etilbenzeno, 93% para meta-xileno e para-xileno e 92,5% para orto-xileno. A DQO particulada atingiu a maior eficiência de 73%, na coleta 7, e a DQO solúvel de 85%, na coleta 13, sendo as médias de 40% e 54% para DQO particulada e solúvel, respectivamente. O fenol, subproduto da degradação dos BTEX, também foi removido do meio pelos micro-organismos, mostrando sua eficiência do sistema.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*, BTEX, matéria orgânica, fenol.

### Introdução

Uma problemática atual é a contaminação de águas, solos e ar por produtos químicos, tanto primários como derivados de algum outro, como, por exemplo, a gasolina, derivada do petróleo através do refino e craqueamento do mesmo. A gasolina possui vários compostos de alta periculosidade que podem produzir efeitos prejudiciais não só para o homem como para o ambiente. (Tiburtius, 2008)

A gasolina apresenta em sua composição, principalmente, alcanos de cadeia linear e cicloalcanos e possui características de combustão insatisfatória, onde uma mistura de ar e gasolina deste tipo tende a sofrer ignição espontânea antes que seja comprimida e receba uma descarga elétrica para provocar sua ignição. A fim de superar esse problema toda gasolina é formulada contendo antidetonantes que durante décadas foi à base de chumbo, mas após ser banido por países desenvolvidos foram utilizados alcanos ramificados, benzeno, tolueno e xileno (BTX) ou compostos orgânicos. A gasolina brasileira possui grande quantidade de etanol e BTEX, sendo estes últimos muito reativos e causam forte poluição do ar (Lourenço, 2006).

Os compostos BTEX, são hidrocarbonetos aromáticos que possuem poder carcinogênico e mutagênico (Calvo *et al.*, 2004; Straube *et al.*, 1999). São também solúveis em água, o que preocupa mais os estudiosos, pois além dessa propriedade existe a recalcitrância destes compostos, aumentando assim a problemática ambiental e trazendo fortes consequências para a saúde pública. Além disso, a gasolina brasileira possui aproximadamente 25% de etanol que aumenta a eficiência de solubilidade e a rapidez da transferência dos compostos BTEX para água (Tiburtius, 2008).

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos que podem ser unicelulares (como leveduras) ou pluricelulares (como os filamentosos), os quais vêm demonstrado eficiência na biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos (Prenafeta-Boldu, 2005).

A via de metabolismo utilizada por fungos não lignolíticos é através de sistema de enzimas para a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos. A maioria dos não lignolíticos são capazes de oxidar hidrocarbonetos aromáticos por um citocromo P-450 monooxigenases. Um átomo da molécula de oxigênio é incorporado no substrato aromático, enquanto o outro átomo de oxigênio é reduzido a água. O óxido de areno formado, em seguida, torna-se um substrato para o metabolismo. A hidratação enzimática do óxido de areno leva à formação de um dihidrodiol com uma configuração trans. Outra via envolve isomerização do óxido de areno para formar um fenol que pode ser conjugada com sulfato, ácido glucurônico, ou glicose (Reineke, 2001).



Segundo Rodrigues (2006), outro aspecto da viabilidade do emprego de fungos na biorremediação de poluentes ocorre pelo fato destes micro-organismos conseguirem se adaptar às mudanças bruscas na concentração de matéria orgânica, variações de pH, temperatura, oxigênio e umidade. A espécie *Aspergillus niger* é capaz de crescer em baixas condições potenciais por possuírem simples necessidades nutricionais (Kavanagh, 2005).

Uma variedade de fungos foi identificada pela capacidade de transformar compostos aromáticos, inclusive hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, em metabólitos semelhantes aqueles produzidos por enzimas de mamíferos, mas só alguns são capazes de transformá-los em CO<sub>2</sub> (Reineke, 2001).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a remoção de matéria orgânica e dos compostos do BTEX em reator de escoamento contínuo com o uso de inóculo fúngico da espécie *Aspergillus niger*, em água poluída por gasolina.

## Material e Métodos

### Cultivo, Produção e Contagem De Esporos De *Aspergillus Níger* An400

Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram cultivados, em placas de Petri estéreis, 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. 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 (4,33 x 10<sup>10</sup> esporos/mL), foram calculados os volumes a serem adicionados ao reator.

### Água poluída por BTEX

Foi utilizada água de torneira à qual foram adicionados solução de micronutrientes (Vishiniac): EDTA – Etileno Diamino Tetracético (10g/L); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (4,4g/L); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0g/L); CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,32g/L); (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,22g/L); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,47g/L); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0g/L) e macronutrientes (g/L): NaNO<sub>3</sub> (0,5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1); MgSO<sub>4</sub> (0,125); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5); H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0,025); MnSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,025); ZnSO<sub>4</sub> (0,02). A gasolina foi adicionada na proporção de 10 mL para cada litro de água, com base no trabalho de Tiburtius (2009), sendo a mistura realizada em um balde de plástico com capacidade de 50 L, o qual era dotado de uma torneira, localizada na parte inferior, pela qual era feita a retirada apenas da fase aquosa contaminada pela gasolina, após um contato de 10 horas com a mesma.

### Reator

O reator cilíndrico de acrílico possuía tampa e entradas de ar – provido por mini-aeradores –, e de água residuária – por onde o afluente adentrava o reator ascendentemente - e saída para o efluente. O reator possuía 95 cm de altura, 90 mm de diâmetro interno e volume total de 5 L (Figura 1). Foram usados dois recipientes com capacidade de 50 L, um para armazenamento da água residuária na entrada do reator – com o afluente succionado e recalado para o reator por uso de uma bomba peristáltica digital –, e o outro para armazenar o efluente após o tratamento, na saída do reator.

O reator foi operado utilizando tempo de detenção hidráulica de 12 horas. A bomba peristáltica utilizada foi do tipo DM modelo 5000, a uma altura manométrica de 1,70 m.



**Figura 1. Reator de leito fixo e fluxo contínuo operado com TDH de 12 h.**

#### **Imobilização da Biomassa**

O meio suporte empregado foi constituído por manta de poliamida esterilizada em autoclave durante 20 minutos a uma temperatura de 121°C, para evitar contaminação. A manta foi cortada em quadrados de 2 x 2 cm e adicionada ao reator. Foi acrescida solução de nutrientes para desenvolvimento e conseqüente crescimento dos fungos. Os esporos foram adicionados na concentração de  $2 \times 10^6$ , ficaram em agitação durante 21 dias somente com meio para o crescimento do microrganismo. Após este período, foram colocados no reator, aerados e utilizado o poluente.

#### **Variáveis Analisadas e Coletas**

As coletas foram realizadas duas vezes por semana. Foram realizadas análises de DQO particulada (bruta) e DQO solúvel (filtrada), pH seguidas de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005) e fenol segundo Merck (1975).

A detecção dos compostos BTEX foi realizada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (FID), coluna capilar BPX-5 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, sob as seguintes condições: hélio como gás de arraste (1 mL/min), temperatura do injetor de 280 °C, temperatura do detector de 280°C, temperatura inicial do forno de 30 °C e temperatura final de 290 °C.

#### **Resultados e Discussão**

A água contaminada sintética mostrou-se sem muita variação nas concentrações das variáveis analisadas, principalmente, em relação aos compostos do BTEX e ao pH, podendo ser explicado pela homogeneização realizada no recipiente onde ocorreu o contato da gasolina e água com nutrientes. O parâmetro que ocorreu menor variação foi o pH, tendo sido seu valor inicial ajustado para benefício dos micro-organismos, conforme relatado por Spier (2005), uma vez que os a maioria dos fungos apresenta maior potencial enzimático em meios com pH no qual os valores encontram-se na faixa entre 3 e 5. Sendo que a faixa entre 4 e 5 propicia para a espécie *Aspergillus niger*.

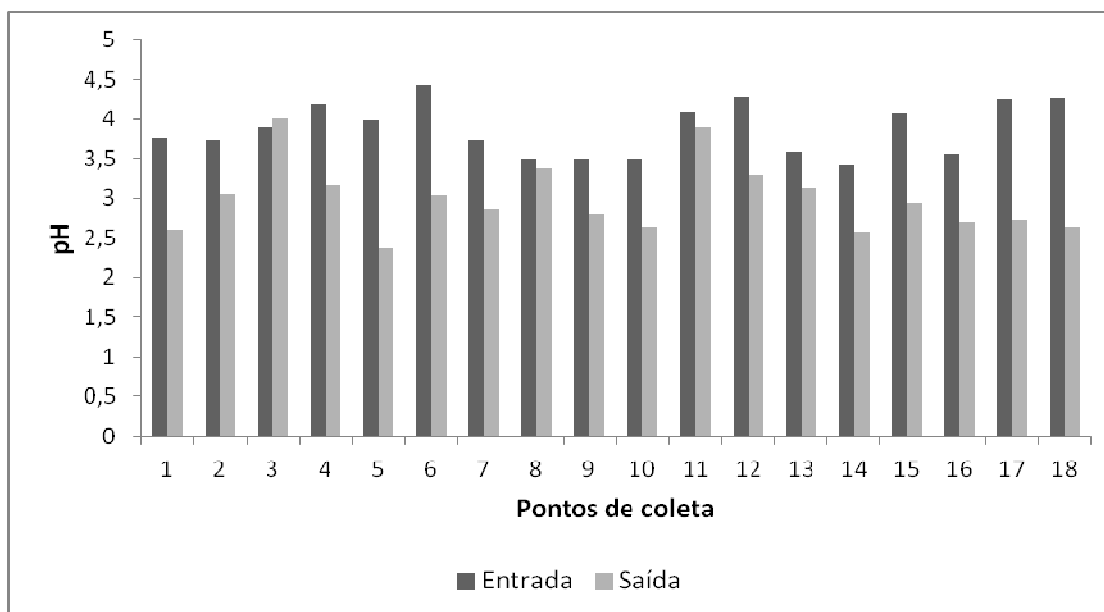
Dentre os compostos BTEX o tolueno e o benzeno foram os que mais sofreram variação e os que se encontravam em maior concentração no meio. Isto ocorreu pelo fato de que entre os compostos BTEX, benzeno e tolueno serem os de maior solubilidade. Segundo Mazzeo (2008), as solubilidades destes compostos são: benzeno com 1780mg/L, tolueno 535mg/L, etilbenzeno 152mg/L e xilenos 135mg/L – valor este que corresponde à solubilidade do isômero menos solúvel, *m*-xileno.

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios de concentração de cada parâmetro analisado e o respectivo desvio padrão. Com exceção do pH, os demais valores médios estão expressos em mg/L.

**Tabela 1 – Caracterização da água poluída com BTEX, na entrada do reator.**

Parâmetro	Valor médio (mg/L)	Desvio Padrão (±)
DQO Particulada	2209,91	640,75
DQO Solúvel	3036,10	840,57
Fenol	3,29	3,15
pH	3,87	0,32
Benzeno	7,67	3,48
Tolueno	33,67	72,31
Etilbenzeno	1,94	1,21
m-xileno e p-xileno	1,94	0,92
o-xileno	2,67	1,22

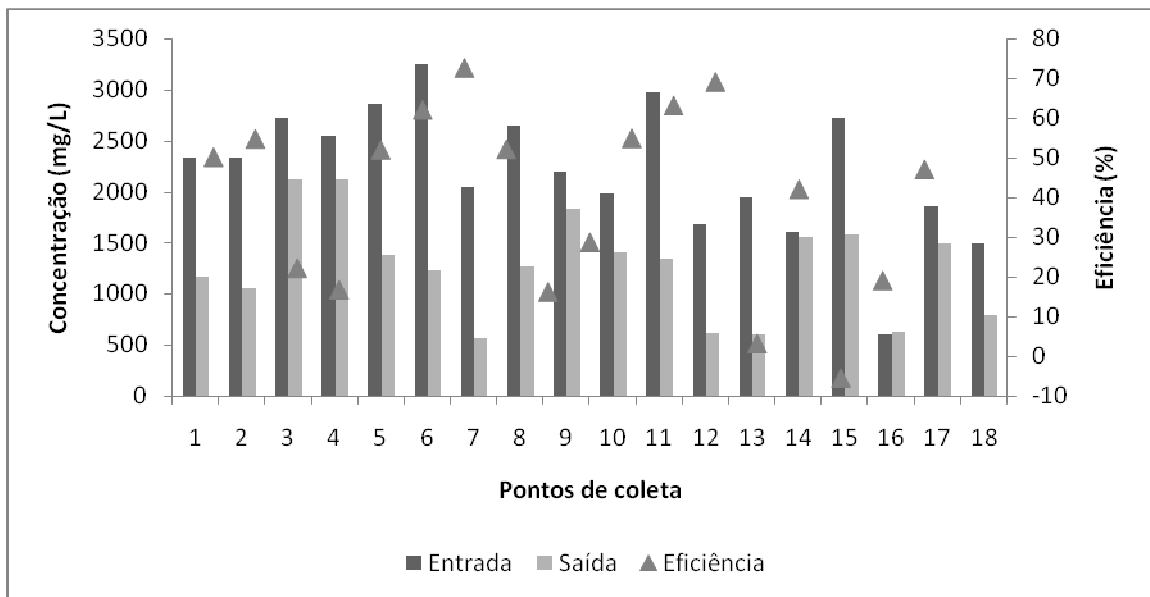
Houve diminuição do pH, em média, de 4 (entrada) para 3 (saída), a qual foi atribuída à formação de ácidos orgânicos pelos fungos. Exceto nos pontos de coleta 3, 8 e 11, não foi observada a diminuição do pH, pois nestes dias ocorreu colmatação do leito suporte e pouca aeração, dificultando assim o metabolismo dos fungos. A variação do pH ao longo da operação do reator de leito fixo e escoamento contínuo é apresentada na figura 2.



**Figura 2: Variação da concentração de pH no reator de escoamento contínuo operado em reator de TDH de 12 horas.**

A remoção do DQO particulada, teve seu ápice na coleta 7 com 73% de eficiência, sendo a eficiência média de 40%, cujo baixo valor foi reflexo da formação de subprodutos em algumas coletas, quando, provavelmente, os micro-organismos não conseguiram fazer a assimilação destes.

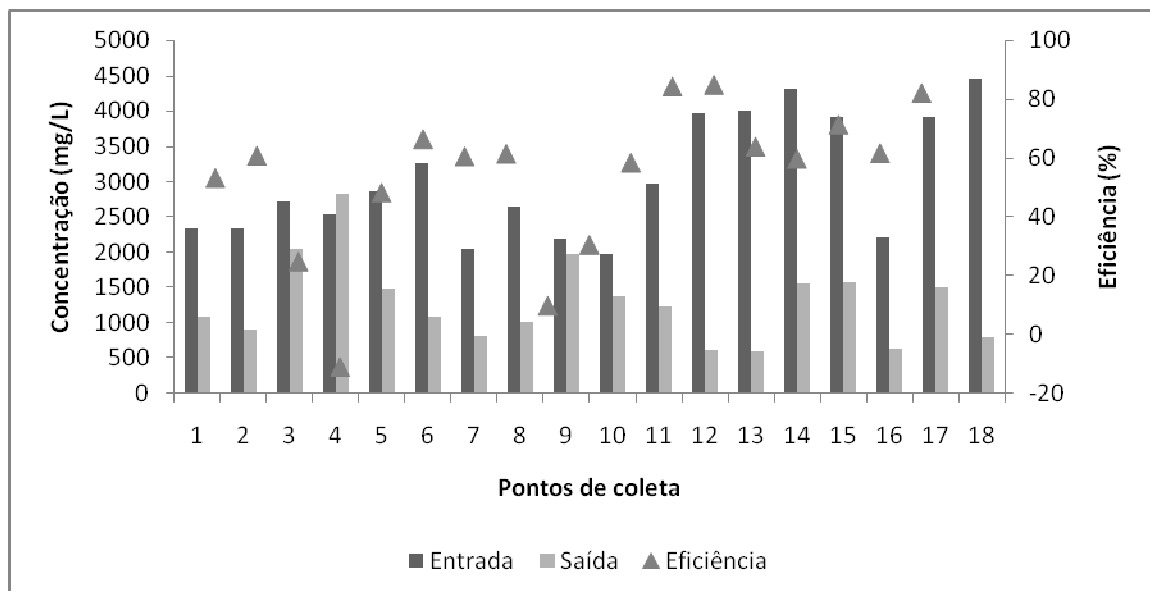
Pode-se visualizar a variação de DQO particulada entre entrada, saída e eficiência na Figura 3.



**Figura 3: Variação da concentração e eficiência de DQO particulada no reator de escoamento contínuo operado em reator de TDH de 12 horas.**

De acordo com a Figura 3, observou-se que a DQO solúvel também foi removida de forma eficiente e sua remoção foi superior à da DQO particulada, podendo ser explicado pelo fato de que a DQO solúvel é analisada sem a presença da biomassa (Siqueira *et al.*, 2010).

O maior valor de remoção de DQO solúvel foi de 85%, na coleta 13 (Figura 4), sendo o valor médio de remoção de 54%. Siqueira *et al.* (2005) conseguiu alcançar eficiência média média de 80%, operando reator em bateladas sequenciais com fungos para remoção de benzeno, tolueno e xileno.



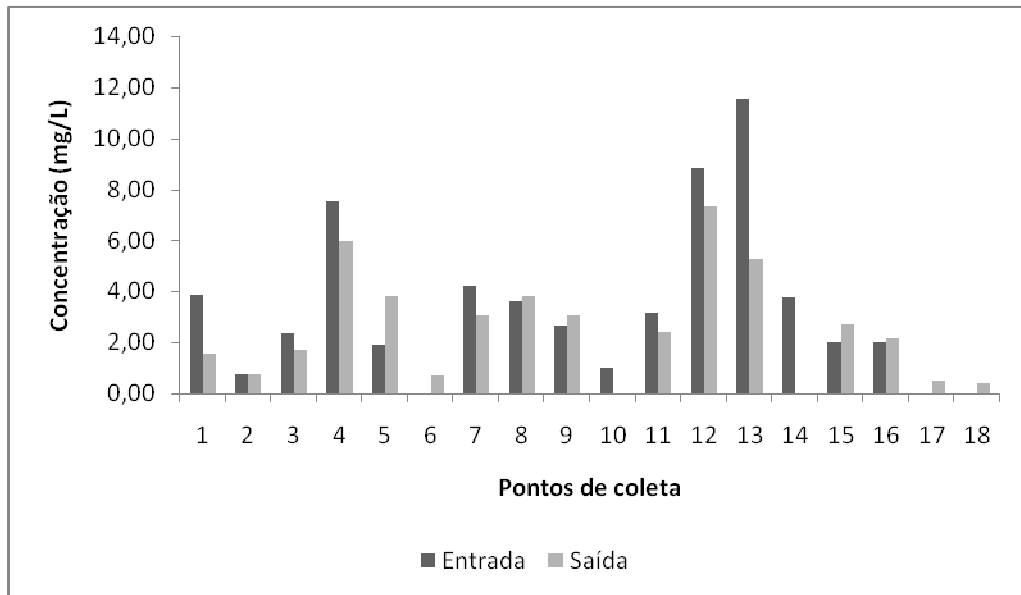
**Figura 4: Variação da concentração e eficiência de DQO solúvel no reator de fluxo contínuo operado em reator de TDH de 12 horas.**

Em geral, admite-se que a degradação do benzeno inicia com a adição de hidroxilas levando a formação de fenóis (Tiburtius apud Utset *et al.*, 2000; Fujishama *et al.*, 2001). Dentre as coletas realizadas, observou-se que foram registrados em algumas coletas (5, 6, 8, 9, 15, 16, 17 e 18) concentrações de fenol maiores no efluente em relação ao afluente, como possível resultado da degradação dos BTEX pelos fungos, haja vista que os fenóis



são subprodutos encontrados na rota de biodegradação dos mesmos por estes micro-organismos, sendo oriundos do anel benzênico que compõe cada um dos BTEX.

Nas coletas em que ocorreu remoção de fenol, verificou-se também a ótima adaptação do fungo ao meio, que se torna capaz de consumir até o subproduto da degradação do BTEX.

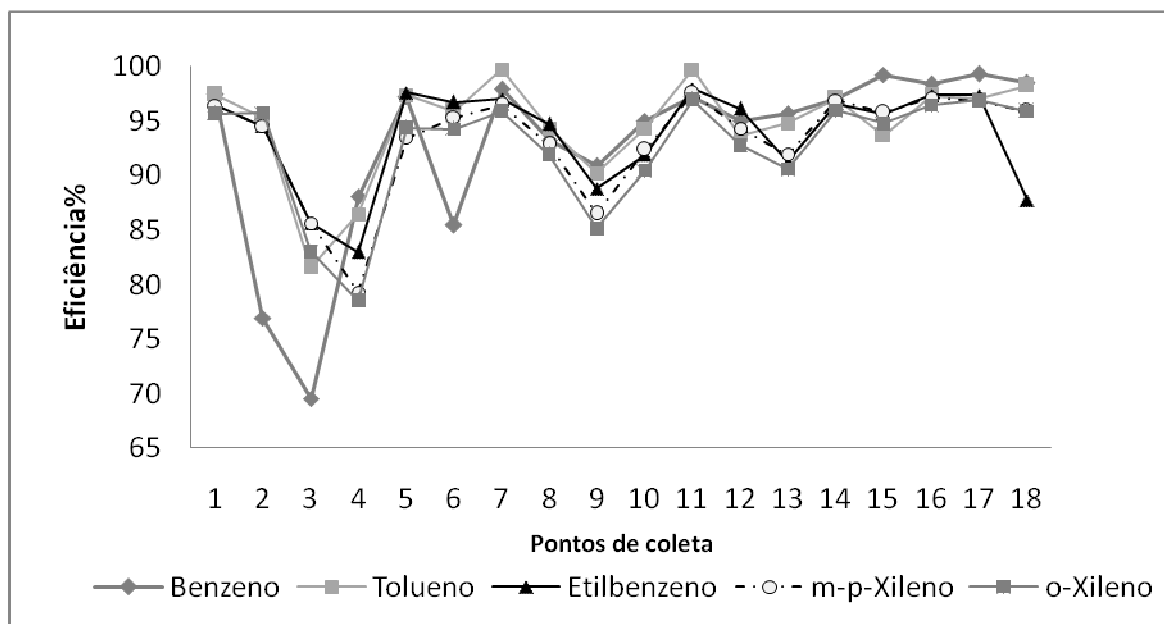


**Figura 5: Variação da concentração de fenol no reator de escoamento contínuo operado em reator de TDH de 12 horas.**

No início da operação do reator, a degradação dos compostos BTEX se deu de forma ineficiente, o que pode ser justificado pelo período de adaptação do fungo. Após este período, evidenciamos boa degradação de todos os compostos, pois já na coleta 5 foi encontrada remoção de 97% do benzeno, 97% do tolueno, 93% do meta-xileno e para-xileno e 94% do orto-xileno (Figura 5).

Foram ainda registradas eficiências máximas de orto-xileno (97%), na coleta 11; benzeno (99%) e meta-xileno e para-xileno (97%), na coleta 17, e tolueno (98%), na coleta 18.

O reator manteve média de remoção de 93% para benzeno, 95% para tolueno, 94% para etilbenzeno, 93% para meta-xileno e para-xileno e 92% para orto-xileno.





**Figura 6: Variação da eficiência de remoção de BTEX no reator de escoamento contínuo operado em reator de TDH de 12 horas.**

### Conclusões

Houve boa eficiência de remoção de compostos BTX, tendo-se alcançado com uso do reator de escoamento contínuo e inóculo fúngico, remoções máximas de 97% do benzeno, 97% do tolueno, 93% do meta-xileno e para-xileno e 94% do orto-xileno.

Em relação à remoção de matéria orgânica, não foram alcançados percentuais de remoção muito elevados. A média obtida no reator foi de 40% para DQO particulada e 54% para DQO solúvel, sendo que a melhor eficiência se deu no ciclo 7 para a DQO particulada (73%) e, no ciclo 13, para a DQO solúvel (85%).

Houve em determinados momentos o cúmulo de fenol no meio, sendo que sua presença pode ser indicativo da biodegradação dos BTEX pelos fungos, sendo os fenóis subprodutos pertencentes à rota de biodegradação destes compostos.

Em face dos resultados apresentados, o sistema pode ser viável para aplicação em tratamento de água contaminadas com BTEX, necessitando porém de mais estudos a fim de maior otimização da tecnologia e sua aplicação em escala piloto.

### Referências Bibliográficas

1. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18 ed Washington: American Public Health Association, 2005.
2. CALVO, C.; TOLEDO, F. L.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*. v. 109, p. 255-262, 2004.
3. KAVANAGH, K. Fungi biology and applications. Department of Biology – National University of Ireland Maynooth, Ireland, 2005.
4. LOURENÇO, E. S. O. Avaliação físico-química da remediação de solos contaminados por BTEX. 2006. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2006.
5. MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do btx, utilizando o sistema teste de *allium cepa*. Unesp – SP
6. MERK. The testing of water. 9th Edition, 1975
7. PRENAFETA-BOLDU', SUMMERBELL, R.; G. SYBREN DE HOOG. Fungigrowing onaromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounterwith biohazard. Amsterdam, 2005.
8. REINEKE, W. Chemistry Biodegradation and Persistence. The Handbook of Environmental. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 2 p. 17. 2001.
9. RODRIGUES, K. de A. Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
10. SIQUEIRA, J. P.; MOREIRA, I. C.; CELESTINO, P.; ARAÚJO, R.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Ação de fungos filamentosos na remoção de hidrocarbonetos aromáticos (btx) em sistema de reator de bateladas sequenciais. In: CONNEPI, Maceió, 2010.
11. STRAUBE, W. L.; JONES-MEEHAN, J.; PRITCHARD, P. H.; JONES, W. R. Benchscale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminates with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. *Resources, Conservations and Recycling*. v. 27, p. 27-37, 1999.
12. TIBURTIUS, E. R. L. Remediação de solos e águas contaminadas por compostos orgânicos voláteis (BTX), utilizando processos fenton e lavagens com biosurfactantes. 2008. 179p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

