

# REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:  
Investigación, desarrollo y práctica.

## REMOÇÃO DE BENZENO, TOLUENO E XILENO EM REATORES FÚNGICOS EM BATELADA

### BENZENE, TOLUENE AND XYLENE REMOVAL FOR FUNGI BATCH REACTOR

\* Carlos Ronald Pessoa Wanderley<sup>1,7</sup>  
João Paulo da Silva Siqueira<sup>1</sup>  
Marcus Vinícius Freire Andrade<sup>2</sup>  
Patrícia Celestino Carvalho de Oliveira<sup>3</sup>  
Iolanda Cristina Silveira Duarte<sup>4</sup>  
Glória Maria Marinho Silva<sup>3,5</sup>  
Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa<sup>3,6</sup>

Recibido el 18 de octubre de 2018; Aceptado el 30 de abril 2020

#### Abstract

Benzene, toluene e xylene are present in gasoline and so a strong threat to the environmental and to public health due to the storage tanks leaks and varied industrial activities. This work aimed at the removal of 30 mg/L of benzene and toluene and 15 mg/L of xylene in aqueous medium by fungal batch reactors. It was also added 100 mg/L of ethanol. The choice of the kind and concentration of cells in the inoculum reactor sequencing batch was made from assay with separated variation of spores concentration of *Aspergillus niger* AN400 e *Penicillium sp.* ( $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^9$  esporos/mL). The sequencing batch reactor (5 L) was inoculated with *Aspergillus niger* and operating at 48 h cycles. The immobilized biomass grown filamentous form. Registered organic matter removal (81%), benzene (60%), toluene (96%) and xylene (50%), respectively. After 4 months of reactor operation, *Penicillium sp.* was found as a contaminating species in the biofilm.

**Keywords:** bateladas sequenciais, crescimento fúngico, hidrocarbonetos aromáticos.

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – *Campus* Maracanaú, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – *Campus* Sobral, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – *Campus* Fortaleza, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – *Campus* Sorocaba, Brasil.

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do IFCE – *Campus* Fortaleza, Brasil.

<sup>6</sup> Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil.

<sup>7</sup> Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil (Recursos Hídricos, Saneamento Ambiental e Geotecnia), Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil.

\* *Autor correspondente:* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) – *Campus* Maracanaú, Rua Virgílio Paes, 2323, Cidade dos Funcionários. Fortaleza, Ceará, Brasil. Email: [ronaldpw25@gmail.com](mailto:ronaldpw25@gmail.com); [ronald@ifce.edu.br](mailto:ronald@ifce.edu.br)

## Resumo

Benzeno, tolueno e xileno estão presentes na gasolina e são uma forte ameaça ao meio ambiente e à saúde pública, devido aos vazamentos de tanques de armazenamento e atividades industriais variadas. Este trabalho objetivou a remoção de 30 mg/L de benzeno tolueno e tolueno e de 15 mg/L de xileno em meio aquoso em reatores fúngicos operados em batelada. Adicionou-se também 100 mg/L de etanol. A escolha da espécie e da concentração de células no inóculo de reator em bateladas sequenciais foi feita a partir de ensaios com variações em separado das concentrações de esporos de *Aspergillus niger* AN400 e *Penicillium* sp. ( $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^9$  esporos/mL). O reator em bateladas sequenciais (5 L) foi inoculado com *Aspergillus niger* AN400 e operado em ciclos de 48 h. A biomassa imobilizada cresceu na forma filamentosa. Registrou-se remoção de matéria orgânica (81%), benzeno (60%), tolueno (96%) e xileno (50%), respectivamente. Após 4 meses de operação do reator, *Penicillium* sp. foi encontrado no biofilme do reator como espécie contaminante.

**Palavras chave:** bateladas sequenciais, crescimento fúngico, hidrocarbonetos aromáticos.

## Introdução

As atividades industriais e os vazamentos acidentais de petróleo e de gasolina – decorrente do envelhecimento de tanques de estocagem – são importante parcela da poluição dos recursos naturais pelos hidrocarbonetos aromáticos benzeno, tolueno e xileno (BTX) (Tiburtius *et al.*, 2005; Ramalho *et al.* 2014; Logeshwaran *et al.*, 2018).

Segundo Trigueros (2008), hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno e os isômeros do xileno, além do etilbenzeno, são os contaminantes mais preocupantes por causa da sua extrema toxicidade. Estes compostos, presentes juntos e/ou isoladamente no meio, são capazes de induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos, como por exemplo, alterações cromossômicas e danos ao DNA, aumentando os riscos de desenvolvimento de câncer pela exposição aos mesmos, particularmente, em relação ao benzeno (Mazzeo *et al.*, 2010; Vergara-Fernandez *et al.*, 2018).

Dos BTX, o benzeno é o mais tóxico, podendo ser absorvido pelo organismo por contato dérmico, inalação e ingestão, sendo metabolizado de forma mais eficiente em concentrações baixas, primeiramente, no fígado e depois na medula óssea, de modo a desencadear doenças como a leucemia, linfóide e mielomonocítica, neoplasmas hematológicos e anemia apática (Santos *et al.*, 2017).” No caso do tolueno, este apresenta absorção fácil pelo trato respiratório, pele e trato gastrointestinal, chegando rapidamente ao tecido adiposo, medula óssea, cérebro, fígado e sangue. A exposição contínua ao tolueno pode ocasionar náuseas, anorexia, perda momentânea de memória, confusão, fadiga muscular e insônia (Figueredo, 2018). Além disso, a inalação do tolueno, principal via de absorção, pode causar irritação do trato respiratório superior e a sua aspiração nos pulmões pode produzir pneumonia química que pode ser fatal (Juras, 2005). Já a exposição ao xileno pode causar desde cefaléia, transtornos da visão, desmaios e irritação das vias respiratórias, até problemas de infertilidade, sendo que, em altos níveis, pode levar o indivíduo exposto à morte (Tiburtius *et al.*, 2005; Figueiredo, 2018).

Um fator preocupante da ocorrência dos BTX no ambiente está relacionado à solubilidade elevada dos BTX em água, característica esta que faz com que estes compostos possam ser transportados a locais distantes do ponto onde aconteceu o derramamento (Lemos *et al.*, 2008; Ramalho *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2016).

Entre as técnicas de despoluição, a utilização de micro-organismos tem alcançado cada vez mais importância mundial (Goltapeh, Danesh e Varma, 2013). Porém, ainda que poucas pesquisas tenham sido realizadas sobre a remoção de benzeno, tolueno, e xileno em reatores biológicos por fungos, os resultados são positivos e este processo representa uma alternativa de custo baixo em relação às outras tecnologias de tratamento (Cheg *et al.*, 2016; Aydin *et al.*, 2017). Segundo Mariano (2006), os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem espécies promissoras na remoção de hidrocarbonetos aromáticos e apresentam crescimento micelial, o que se constitui em vantagem sobre as células unicelulares, bactérias e leveduras, devido à rápida ramificação do micélio no substrato, potencializando a biodegradação através da secreção de enzimas extracelulares variadas e da grande área superficial de contato entre micélio e poluente, sobretudo quando aplicados em reatores com biomassa imobilizada, elevando a eficiência do tratamento de águas residuárias (Rodrigues, 2006; Oliveira, 2019).

Os fungos são também mais tolerantes às condições ácidas que as bactérias e apresentam capacidade de suportar mudanças bruscas de carga orgânica, tolerar grandes variações de pH e de temperatura e se adequar a variações e escassez de umidade e de oxigênio (Estévez, Viega e Kennes, 2005). Além disso, os fungos são produtores de variado número de enzimas capazes de degradarem inúmeros poluentes, sendo extremamente tolerantes ao estresse e à ação de substâncias químicas tóxicas (Oliveira, 2019). A concentração de esporos no inóculo é variável importante por influenciar na reologia do meio, forma de crescimento microbiano e, por consequência, na eficiência dos reatores, podendo conduzir ao sucesso ou à falência do processo (Papagianni e Moo-Young, 2002; Papagianni, 2014).

A concentração de células no inóculo influencia na germinação e na forma de crescimento, em *pellets* ou filamentosos, consequentemente, o metabolismo e a formação de subprodutos pelos fungos, o que poderá exigir maior ou menor controle das condições do meio (Aldars-García *et al.*, 2018). Na maioria das vezes, a operação com *pellets* – situação teoricamente mais favorável para evitar a ocorrência de problemas de limitação difusional e a consequente perda de eficiência –, visando à biorremediação de poluentes, não é possível, em virtude da produção de ácidos orgânicos e do metabolismo do nitrogênio que podem interferir fortemente e diminuir o pH do meio, resultando na formação de biomassa filamentosos (Papagianni e Moo-Young, 2002; Borrás *et al.*, 2008; Oliveira, 2019).

Em geral, ácidos orgânicos e outros compostos que contribuem para abaixar o pH do meio e são reflexo da assimilação dos poluentes como substrato, que são biodegradados pela ação de enzimas não específicas (Kyriacou *et al.*, 2005; Dalecka, Juhna e Rajarao, 2020). Por outro lado, o uso de alcalinizantes para controlar o pH, nem sempre é viável, uma vez que a maioria das enzimas produzidas pelos fungos para a degradação dos poluentes têm seu ápice na faixa ácida de pH (Spier, 2006; El-Naas, Acio e El Telibe, 2014; Hassan *et al.*, 2019), requerendo conhecimento da partida e da rotina operacional a fim de manter a eficiência do sistema mesmo que este apresente biofilme com tendência ao crescimento filamentosos. A aplicação de fungos em reatores para a remoção de BTX pode ser uma alternativa viável, sobretudo quando do emprego de reator em bateladas sequenciais que possui menor utilização de mão-de-obra e de energia, facilidade de alteração do tempo reacional e nível de controle de processo não encontrado facilmente em sistemas de fluxo contínuo (Mohan *et al.*, 2007).

Dentro deste contexto, foi estudado o potencial da aplicação de fungos filamentosos como inóculo de reator biológico em bateladas sequenciais na remoção de compostos BTX de meio aquoso, tendo-se verificado, em ensaio preliminar, a concentração de esporos a ser empregada no inóculo de reator em bateladas sequenciais (RBS) com biomassa fúngica imobilizada em espuma de poliuretano.

## Metodologia

### Cultivo e produção dos esporos fúngicos

Foram preparadas placas de Petri estéreis, com 15 mL de meio de cultura *Saboraud Dextrose*, previamente esterilizado a 121 °C, durante 15 minutos, adicionando de 1 mL/L de solução de Vishniac, constituída de (mg/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (50), FeCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O (2000), ZnCl<sub>2</sub> (50), MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O (500), CuCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O (38), AlCl<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O (90), CoCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O (2000).

Após a solidificação do meio de cultura, os esporos de *Aspergillus niger* AN400 e de *Penicillium* sp. foram mantidos em tubos de ensaio sob temperatura de ± 4 °C e, posteriormente, inoculados em placas de *Petri* que permaneceram em repouso durante 7 dias, a ± 28°C, para crescimento e posterior remoção. A remoção dos esporos foi realizada adicionando-se à cada placa 25 µL de *Tween 80*, diluído em 500 mL de solução salina de NaCl (0.08 mg/L). "A remoção da suspensão de esporos das placas e a determinação da sua concentração ocorreu conforme descrito em Silva et al. (2018)."

### Meio aquoso

O meio foi preparado com água oriunda do sistema de abastecimento e 0,5 g/L de glicose, como co-substrato. Adicionou-se macro e micronutrientes nas concentrações de (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5); NaNO<sub>3</sub> (0.25); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.2); MgSO<sub>4</sub> (0.25); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.01); CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.08); H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0.05);

MnSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0.05); Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (0.05); ZnSO<sub>4</sub> (0.04), conforme Rodrigues (2006). A concentração de benzeno e tolueno foi de 30 mg/L e a de xileno, de 15 mg/L. Para melhor solubilizar os compostos no meio foi utilizado 100 mg/L de etanol.

#### Ensaio para escolha da concentração de esporos no inóculo do RBS (Etapa I)

Foram utilizados frascos de vidro de 250 mL, previamente autoclavados a 121°C, durante 20 minutos, que receberam 200 mL do meio aquoso contendo BTX, descrito anteriormente. Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm, em mesa agitadora. Os reatores foram divididos em lotes, cada um com: 7 reatores controle (RC), ausentes de micro-organismos; 7 reatores com inóculo de *Aspergillus niger* AN400 (RA) e 7 reatores com inóculo de *Penicillium* sp. (RP).

Os reatores foram operados em regime de batelada e, em cada grupo de reatores, estes possuíam um tempo reacional distinto, os quais eram de 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 9 dias. Para cada espécie de fungos em estudo foi variada a concentração de esporos do inóculo: (I) 2x10<sup>3</sup> esporos/mL, (II) 2x10<sup>6</sup> esporos/mL e (III) 2x10<sup>9</sup> esporos/mL. Todos os procedimentos de preparo e adição do inóculo nos reatores foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical para evitar contaminação, de modo que, após os quais, os reatores foram então transferidos para mesa agitadora. O experimento foi conduzido em duplicata.

#### Imobilização da biomassa fúngica (Etapa II)

O *Aspergillus niger* AN400 foi inoculado, na concentração de 2 x 10<sup>6</sup> esporos/mL, em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo cubos de poliuretano com 1 cm de aresta. Os cubos de poliuretano foram acondicionados em redes de polietileno e, posteriormente, foram imersos em 200 mL de meio de crescimento contendo glicose (5 g/L) e cloranfenicol (0.10 g/L). Os frascos foram mantidos a 150 rpm, em mesa agitadora durante 120 h, sendo que, ao completadas 48 horas, o meio era substituído por um novo. Passadas as 120 h, as redes contendo os cubos de espuma de poliuretano e a biomassa já crescida eram transferidos para o reator, a fim de iniciar a operação do mesmo. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método de Kruskal Wallis.

#### Operação do reator em bateladas sequenciais (RBS)

O reator utilizado era de vidro e possuía volume total de 5 L, tendo recebido como inóculo biomassa de *Aspergillus niger* AN400, aderida em espuma de poliuretano, conforme descrito anteriormente, e alimentado com 4 L de meio aquoso, contendo os compostos BTX. A oxigenação do meio reacional foi mantida com a introdução de ar a partir de um mini-compressor. A operação do reator foi realizada em 12 ciclos, cada um com duração de 48 horas. O período total de operação do RBS, nestas condições, foi de 4 meses. Antes do início desta etapa de trabalho, o reator já vinha sendo operado por seis meses (dados não apresentados) e a alimentação, naquele período, foi feita com o mesmo meio aquoso, excetuando-se as concentrações de glicose (1 e 5 mg/L) e dos compostos BTX, de 100 mg/L para cada um dos hidrocarbonetos adicionados. Para



evitar a possibilidade de fotodegradação dos compostos BTX, o reator foi protegido da luz e mantido em local escuro.

### Variáveis

Foram determinadas as variáveis: potencial hidrogeniônico (pH), sólidos suspensos voláteis (SSV) e DQO, conforme metodologia descrita em APHA (2005), e benzeno, tolueno e xileno, detectados por cromatografia gasosa (CG) em cromatógrafo Clarus 500 (Perkin Elmer) e coluna 30 metros. As absorvâncias das análises foram detectadas através do espectrofotômetro de marca Biospectro e modelo SP – 200, já o pH foi medido em pHmetro da Quimis, modelo Q – 400 A.

### Contagem de micro-organismos na água residuária

A contagem de micro-organismos foi feita segundo os procedimentos de diluição seriada e verificação do crescimento e número de unidades formadoras de colônias em meios seletivos, de acordo com os procedimentos relatados em Silva *et al.* (2015) e Andrade *et al.* (2015), sendo a temperatura de incubação de 28°C.

## **Resultados e discussões**

### Determinação da espécie fúngica e da concentração de esporos no inóculo do reator RBS-Etapa I

Para ambas as espécies estudadas, as maiores eficiências de diminuição da DQO foram para a concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL, com remoções finais de matéria orgânica de 67%, 74% e 61% para RAI, RAI1 e RAI3, respectivamente, e de 59%, 70% e 62%, para os reatores RPI, RPI1 e RPI3, respectivamente. Nesta concentração, embora *Aspergillus niger* tenha alcançado percentual superior de remoção de DQO (74%) em relação à *Penicillium* sp. (70%), a análise estatística mostrou que a diferença não foi significativa ( $p: 0,002 < 0,005$ ).

Kyriacou *et al.* (2005) empregaram duas concentrações de esporos de *Aspergillus niger* ( $1 \times 10^4$  esporos/mL e  $1 \times 10^6$  esporos/mL) em reator de batelada tratando água residuária da indústria de azeite de oliva, com tempo reacional de 4 dias relataram que para concentração elevada de  $2 \times 10^9$  esporos/mL, ocorreu diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica. Semelhantemente, Tung *et al.* (2004) usaram *Aspergillus oryzae* em reatores de 100 mL para tratar água residuária do processamento de mandioca, com diferentes tamanhos de inóculo, e verificaram que para as concentrações superiores a  $7.2 \times 10^4$  esporos/mL, não houve aumento de biomassa e da eficiência de remoção de matéria orgânica.

Anuradha *et al.* (2014) verificaram a máxima produção de enzima polygalactunorase para a concentração de  $1 \times 10^6$  esporos/mL de *Aspergillus Awamori* MTCC 9166, em pH de 5,5, com a biomassa fúngica crescendo na forma de *pellets*. De acordo com os autores o pH é um fator importante que afeta diretamente a produção enzimática, contudo o tamanho do inóculo pode

favorecer a maior produção das enzimas, de modo que ao trabalharem com concentrações de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$ , houve decréscimo da produção enzimática.

Na presente pesquisa, houve aumento de biomassa (SSV), no final da batelada, 295 mg/L (RAI), 224 mg/L (RAII) e 230 mg/L (RAIII) e de 220 mg/L (RPI), 243 mg/L (RPII) e 311 mg/L (RPIII). Nos reatores de controle (RC) foi obtido 63 mg/L de SSV, no 9º dia reacional, mas sem crescimento visual de biomassa no meio. Paralelamente ao aumento de biomassa, houve remoção de BTX, com os reatores RAI, RAII e RAIII a alcançar remoções de 99.9% de benzeno (3º dia) e tolueno (4º dia), percentual este que, em RAII, ocorreu no 3º dia e 2º dia, respectivamente, para benzeno e tolueno. O xileno foi detectado pelo método em todos os tempos reacionais, com remoções percentuais, no 9º dia de reação, de 33% (RAI), 57% (RAII) e 24% (RAIII).

Nos reatores com *Penicillium sp.*, também foram registradas remoções de 99.9% para benzeno e tolueno antes do último tempo reacional. Foi obtida remoção de 99.9% destes compostos em RPI (3º dia). Em RPII, benzeno e tolueno não mais foram detectados no meio no 3º e 2º dia, respectivamente. Já em RPIII, a remoção de 99.9% de benzeno e tolueno ocorreu no 4º e 2º dia, respectivamente. As menores eficiências de remoção nos reatores com *Penicillium sp.* também foram de xileno e, no 9º dia, foram obtidas remoções de 28%, 40% e 29% para RPI, RPII e RPIII respectivamente. Os reatores com *Aspergillus niger* e (RAI, RAII e RAIII) *Penicillium sp.* (RPI, RPII e RPIII) removeram mais facilmente o tolueno, seguido por benzeno e xileno, sendo que este último, diferentemente dos outros compostos, persistiu no meio até o tempo reacional de 9 dias. Os xilenos que possuem dois grupos metis e sua degradação se inicia pela oxidação de um deles, formando subprodutos capazes de inibir a ação dos micro-organismos (Maliyekkal *et al.*, 2006).

Nos reatores de controle a remoção de DQO foi inferior à obtida nos reatores com inóculo fúngico, de 32%. Da mesma forma, as eficiências de remoção dos compostos BTX em RC foram baixas em comparação aos reatores com *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.*, registrando-se eficiências de 47%, 55% e 21% para os compostos benzeno, tolueno e xileno, respectivamente, no 9º dia reacional. Observou-se que, para  $2 \times 10^9$  esporos/mL, não ocorreu melhora na remoção de BTX e de matéria orgânica, tanto nos reatores RA quanto nos RP. Quando da adição de inóculo ocorre com concentrações superiores a  $10^8$  esporos/mL, a biomassa cresce na forma filamentosa, e, neste caso, há maior dificuldade em manter o meio homogêneo e a concentração de oxigênio dissolvido adequada, além de haver produção de toxinas que contribuem para inviabilizar a germinação dos esporos, comprometendo o crescimento da biomassa (Papagianni e Moo-Young, 2002; Tung *et al.*, 2004; Aldars-García *et al.*, 2018).

No presente trabalho, em ambos os grupos de reatores, o meio possuía oxigênio dissolvido em torno de 7 mg/L. Houve formação de biomassa filamentosa nos reatores que continham inóculos de *Aspergillus niger* AN400 e *Penicillium sp.* com concentração de  $2 \times 10^9$  esporos/mL. Nos reatores RAI e RAII – nas concentrações mais baixas, de  $2 \times 10^3$  esporos/mL e  $2 \times 10^6$  esporos/mL

– a biomassa cresceu na forma de *pellets* até o tempo reacional de 3 dias, quando foram registrados valores de pH de 4,5 e 5,0, respectivamente. Após este período, a biomassa contida em RAI e RAII passou para a forma filamentosa, provavelmente, devido à diminuição do pH do meio, cujo valor médio inicial foi de 5. Essa diminuição do pH também foi observada nos reatores que receberam esporos de *Penicillium* sp..

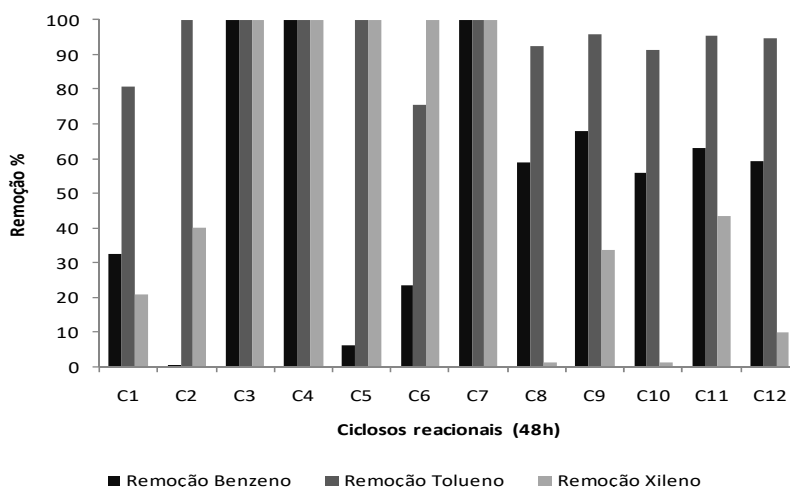
Foram registrados valores finais de pH de 4 e 3, respectivamente, em RAI e RAII e RAIII, os quais continham inóculo de *Aspergillus niger*. Para os reatores que receberam inóculo de *Penicillium* sp. o meio apresentou pH de 3, no último dia da batelada, em todas as concentrações de esporos utilizadas como inóculo, o que pode ter sido influenciado pela excreção de ácidos orgânicos gerados a partir da metabolização dos BTX e de outros componentes do meio (Varjani, 2017), tendo contribuído para favorecer a dispersão de esporos e o crescimento da biomassa na forma filamentosa, já que a superfície dos esporos estava protonada, evitando formar *pellets* (Oliveira, Bassin e Cammarota, 2019).

Os resultados indicaram que, para ambas as espécies, mesmo com os inóculos de menores concentrações de esporos –  $2 \times 10^3$  e  $2 \times 10^6$  esporos/mL – o crescimento filamentoso predominou devido à diminuição do pH do meio, tendo sido a variável de maior influência na morfologia dos fungos. As remoções foram de quase 100% para benzeno e tolueno, sendo que tanto para *Aspergillus niger* AN400 como *Penicillium* sp. foram obtidos percentuais de eficiência similares e em tempos reacionais próximos ou iguais, não ocorrendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na remoção de benzeno e tolueno nas três concentrações de esporos estudadas. Já para o xileno, a análise estatística dos dados apontou para diferença significativa entre os valores registrados para *Aspergillus niger* AN400 e *Penicillium* sp., endossando que a segunda espécie foi mais eficiente na remoção deste hidrocarboneto, particularmente para RAII e RPII ( $p: 0,0002$ ) e RAIII e RPIII ( $p: 0,0003 < 0,05$ ). Devido à remoção de xileno ter sido superior nos reatores RA, na concentração intermediária de inóculo  $2 \times 10^6$  esporos/mL, *Aspergillus niger* AN400 foi utilizada no RBS.

#### Operação do reator em bateladas sequenciais (RBS) – Etapa II

O reator RBS alcançou 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, de 97% (ciclo 12). Houve aumento gradativo da eficiência com o decorrer da operação do reator RBS. A melhor remoção de DQO solúvel, em comparação a DQO particulada, pode ser explicada pela presença de fragmentos pequenos desprendidos do biofilme que cresceu na forma filamentosa, devido aos valores baixos de pH no efluente no final dos ciclos operacionais, em média de 2.5. O pH médio registrado no afluente do ciclo operacional era de 4.6. A imobilização da biomassa, apesar do crescimento filamentoso, contribuiu para as melhores remoções de DQO encontradas em relação à Etapa I. Em relação à remoção de BTX, foram alcançadas remoções médias de 60%, 96% e 50% para benzeno, tolueno e xileno, respectivamente (Figura 1).





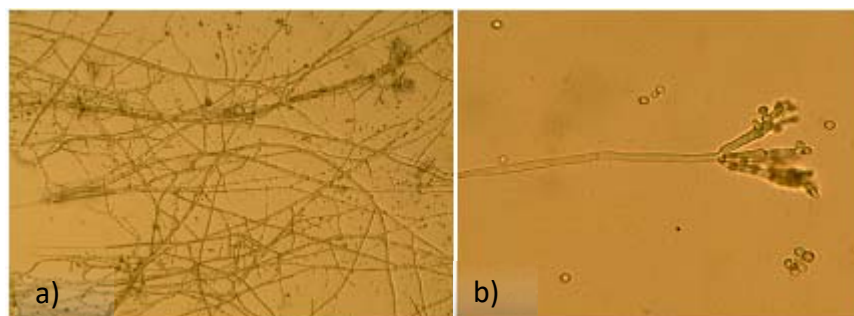
**Figura 1.** Variação da eficiência de remoção de compostos BTX pelo reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN400.

O benzeno não foi detectado no efluente do 3º, 4º e 7º ciclo, assim como tolueno, no efluente do 2º ao 5º ciclo e no 7º ciclo. As menores eficiências de remoção de BTX ocorreram, no 1º ciclo, para o tolueno (81%) e, no 8º ciclo, para o xileno (1%). Em relação ao benzeno, no 2º ciclo, não se observou sua remoção do meio. A obtenção de menor eficiência de remoção de benzeno, em relação à Etapa I, decorreu do menor tempo de reação submetido aos micro-organismos, de 48 h, enquanto que naquela etapa o mesmo era de 3 dias (72 h).

O benzeno e o xileno são compostos de grande dificuldade de biodegradação (García-Peña *et al.*, 2008). Porém, no caso do xileno, o percentual médio de remoção registrado foi superior às maiores eficiências de remoção deste composto encontradas na Etapa I, tanto para o *Aspergillus niger* quanto para o *Penicillium sp.*, na mesma concentração de inóculo de  $2 \times 10^6$  esporos/mL, as quais foram, respectivamente, de 42% e 40%.

O tolueno foi removido mais facilmente, seguido do benzeno e do xileno, assim como ocorrido na Etapa I. Semelhantemente, García-Peña *et al.* (2008) ao utilizarem inóculo de *Paecilomyces variotii*, obtiveram degradação inicial de tolueno, seguido de etilbenzeno, benzeno e, por último, do xileno. A degradação de hidrocarbonetos aromáticos por fungos ocorre geralmente pela ação de enzimas mono-oxigenases, formando transdiol, sendo comum a formação de cis-dihidrodiol pela incorporação de átomos de oxigênio, resultando posteriormente na geração de catecóis. Ácidos, aldeídos e CO<sub>2</sub> também são produtos finais da biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos por fungos e bactéria, sendo os primeiros mais tolerantes ao meio ácido (Varjani, 2017; Logeshwaran *et al.*, 2018). Neste trabalho, os valores de pH para o afluente e efluente dos ciclos operacionais estiveram sempre em faixa ácida, com valores médios, respectivamente, de

4.6 e 2.5. No final da pesquisa, a análise de microscopia mostrou que houve contaminação do meio por outra espécie de fungo, a qual foi posteriormente identificada como *Penicillium* sp. (Figura 2).



**Figura 2.** Espécie contaminante *Penicillium* sp. encontrada no reator em bateladas sequenciais com inóculo de *Aspergillus niger* AN400: a) Vista do conjunto de hifas; b) Conidióforo típico da espécie visualizadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

A diminuição da aeração, causada por problema no fornecimento do ar, pode ter influenciado na contaminação do meio pelo *Penicillium* sp., favorecendo o crescimento desta espécie que, de acordo com Brackmann *et al.* (1996) tem seu crescimento estimulado à medida que a concentração do oxigênio diminui até 0.2% (v/v). Além disso, o gênero *Penicillium* pode produzir metabólitos capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos, conforme relatado em Grijseels *et al.* (2017) que verificaram a produção de 34 metabólitos secundários pelo gênero *Penicillium* em fermentação submersa, os quais possuem efeito antibacteriano e antifúngico.

Assim, o meio aquoso contendo BTX e nutrientes ofereceu características ótimas para desenvolvimento do *Penicillium* sp. que inibiu o *Aspergillus niger* AN400 e predominou no biofilme. A contagem de colônias revelou  $5 \cdot 10^9$  UFC/mL para os fungos e sem crescimento de bactérias nas placas.

### Conclusão

A concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL foi a mais adequada como inóculo para *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., em face das maiores remoções alcançadas em relação à matéria orgânica e aos compostos BTX, chegando à remoções de 74% e de 70% de DQO solúvel, respectivamente, para *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., não sendo detectados benzeno e tolueno no meio no 3º e 2º dia. Quando da operação do reator em bateladas sequenciais, a espécie contaminante *Penicillium* sp. predominou no biofilme. O crescimento foi do tipo filamentososo, em decorrência do pH baixo do meio (< 4,0), registrando-se aumento da eficiência de remoção de matéria orgânica e de BTX.

Observou-se que houve biodegradação preferencial de tolueno, benzeno e, por último, de xileno, sendo que o uso de fungos em reatores biológicos para despoluição de águas contendo BTX pode ser uma tecnologia viável.

### Agradecimentos

À Deus e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de iniciação científica.

### Referências

- Aldars-García, L., Marín, S., Sanchis, V., Magan, N., Medina, A. (2018). Assessment of intraspecies variability in fungal growth initiation of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production under static and changing temperature levels using different initial conidial inoculum levels. *International Journal of Food Microbiology*, **272**, 1-11.
- Andrade, M. V. F., Leite, A., Máximo, H. O., Wanderley, C. R. P., Silva, G. M. M., Rodrigues, K. (2015). Uso de fungo da podridão branca na biodegradação de corante têxtil em reator em bateladas sequenciais. *Revista de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, **2**, 220-236.
- Apha (2005). *Standard methods for water and wastewater examination*, 21th ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Aydin, S., Karaçay, H. A., Shahi, A., Gökçe, S., Ince, B., Ince, O. (2017). Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Fungal Biology Reviews*, **31**, 61-72.
- Brackmann, A., Saquet, A.A, Veiga, V. V. (1996). Efeito das concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> sobre a supressão do crescimento e esporulação de *Penicillium expansum*. *Rev. Bras. de Agrociência*, **2**(3), 147-150.
- Cheng, Z., Lu, L., Kennes, C., Yu, Jianming, Chen, Jianming (2016). Treatment of gaseous toluene in three biofilters inoculated withfungi/bacteria: Microbial analysis, performance and starvationresponse. *Journal of Hazardous Materials*, **303**, 83-93.
- Dalecka, B., Juhna, T., Rajarao, G. K. (2020). Constructive use of filamentous fungi to remove pharmaceutical substances from wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, **33**, 2-8.
- Estévez, E., Veiga, M.C., Kennes, C. (2005). Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32**, 33-37.
- El-Naas, M. H., Acio, J. A., El Telib, A. E. (2014). Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2**, 1104-1122.
- Estévez, E., Veiga, M.C., Kennes, C. (2005). Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *xophiala oligosperma*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **32**(1), 33-37.
- Figueiredo, V. O. (2018). Avaliação da exposição ao benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em trabalhadores expostos ocupacionalmente no município do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 83 pp.
- García-Peña, I., Ortiz, I., Hernández, S., Revah, S. (2008). Biofiltration of BTEX by fungus *Paecilomyces variotti*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**, 442-447.
- Grijseels, S., Nielsen, J. C., Larsen, J. C., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Frandsen, R. J. N., Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biology and Biotechnology*, **4**. doi: <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0036-z>
- Hassan, N., Rafiq, M., Rehman, M., Sajjad, W., Hasan, F., Abdullah, S. (2019). Fungi in acidic fire: A potential source of industrially important enzymes. *Fungal Biology Reviews*, **33**, 58-71.

- Juras, I. A. G. M. (2005). Impacto à saúde e ao meio ambiente do aumento irregular de solventes na gasolina. Estudo de consultoria para a Câmara de Deputados de Brasília, 20 pp.
- Kyriacou, A., Lasaridi, K. E., Kotsou, M., Balis, C., Pilidis, G. (2005). Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater. *Process Biochemistry*, **40**, 1401-1408.
- Lemos, J. L. S., Oliveira, S. D., Barros, C. A., Reiche, A. P. (2008). Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (haps). *Série Tecnologia Ambiental*, **46**. Acesso em 28 de setembro de 2018, disponível em: <http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/323/1/sta-46.pdf>
- Logeshwaran, P., Mallavarapu, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R. (2018). Petroleum hydrocarbons (ph) in groundwater aquifers: an overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology and Innovation*, **10**, 175-193.
- Maliyekkal, S. M., Rene, E. R., Philip, L., Swaminathan, T. (2004). Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *J Hazard Mater*, **109**, 201-211.
- Mariano, A. P. (2006). Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel, Tese de doutorado em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, 130 pp.
- Mazzeo, D. E. C., Levy, C. E., Angelis, D. F. de, Marin-Morales, M. A. (2010). BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*, **408**, 4334-4340.
- Mohan, S. V., Rao, N. C., Sarma, P. N. (2007). Low-biodegradable composite chemical wastewater treatment by biofilm configured sequencing batch reactor (SBBR). *Journal of Hazardous Materials*, **144**, 108-117.
- Oliveira, H., Bassin, I. D., Cammarota, M. C. (2019). Biofloculação de cyanobacteria with pellets of *Aspergillus niger*: effects of carbon supplementation, pellet diameter and other factors in biomass densification. *Bioresource Technology*, **294**, 1-7.
- Papagianni, M. (2014). Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques. *Microbial & Biochemical Technology*, **6**, 189-94.
- Papagianni, M; Moo-Young, M. (2002). Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry*, **37**, 1271-1278.
- Ramalho, A. M. Z., Sobrinho, H. L. A., Dos Anjos, R. B., Dantas, T. N. C., Silva, D. R. (2014). Study of contamination by benzene due diesel and gasoline leaks at a gas station in Natal/Brazil, **14**, 49-54.
- Rodrigues, K. A. (2006). Uso de reator biológico com fungos para remoção de fenol de uma água residuária sintética, Tese de doutorado em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 144 pp.
- Silva, G. M. M., Pinheiro, G. C., Barbosa, B. C. A., Pereira, L. J. R., Pessoa, K. A. R. (2018). Biodegradação de Paraquat e produção de celulase em reatores inoculados com fungos e resíduo lignocelulósico. *Revista DAE*, **66**, 50-61.
- Spier M. R., Woiciechowski, A. L., Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R. (2006). Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial products. *International Journal of Food Engineering*, **2**(3), 1-20.
- Tiburtius, E. R. L., Peralta-Zamora, P. P., Emmel, A., Leal, E. S. (2005). Degradação de btxs via processos oxidativos avançados. *Química Nova*, **28**(1), 61-64.
- Trigueros, D. E. G. (2008). Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 150 pp.
- Tung, T.Q., Miyata, N., Iwahori, K. (2004). Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. *J.Bioscience Bioengineering*, **97**, 329-335.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource and Technology*, **223**, 277-286.