

AMPLIAÇÃO DE ESCALA DA BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO POR ASPERGILLUS VERSICOLOR

Leonardo Tupi Caldas Pereira

Bolsista de Inic. Científica, Eng^a. Química, UFRJ

Judith Liliana Solorzano Lemos

Orientadora, Eng^a. Química, D. Sc.

RESUMO

O estudo da biodegradação de solos impactados pelo derramamento de petróleo, usando fungos filamentosos é um desafio que nosso grupo de pesquisa vem enfrentando com o auxílio de microrganismos isolados de solos contaminados. Até o presente momento foram realizados estudos em microcosmos (Pereira e Lemos, 2003) que permitiram estabelecer parâmetros importantes como a temperatura, capacidade de

retenção de água (CRA) e pH), tanto para o metabolismo do fungo como para otimização do processo biológico em biorreator. Os dados experimentais mostraram que dentre as condições estudadas o melhor resultado de biodegradação foi alcançado utilizando biorreator estático, com o qual foi atingido 20% de remoção de matéria orgânica quando comparado ao resultado alcançado com o biorreator de eixo rotativo que foi de 13 %.

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIORREMEDIAÇÃO POR FUNGOS FILAMENTOSOS

A utilização de tecnologias inovativas de tratamento, contempla em suas formas mais variadas, a utilização de biorremediação. Entende-se por biorremediação a utilização de um ou mais consórcios microbianos, indígenas ou não, para a degradação de contaminantes orgânicos, entre eles os hidrocarbonetos de petróleo. Estes microrganismos “quebram” os hidrocarbonetos de petróleo visando utilizá-los no seu metabolismo. Os parâmetros temperatura, umidade, fluxo de oxigênio, pH, e os nutrientes (fósforo e nitrogênio), podem ser empregados para implementar o processo de biodegradação através do bioestímulo (PANDEY *et al.*, 2000).

1.2. FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO E BIORREATORES

Os fungos filamentosos por possuir uma peculiar capacidade de crescer em locais de baixa umidade relativa e, na ausência de água livre, são por estas razões, os que melhor se adaptam ao processo fermentativo em substrato sólido (FSS). Fermentação em substrato sólido pode ser definida como o processo que refere-se à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo do líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro lado, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DURAND *et al.*, 1988).

Os processos de FSS, são realizados em biorreatores classificados como reatores em fase não-aquosa, que podem ser:

- Reatores estáticos (Reator em Bandeja);
- Reatores com agitação;
- Reatores com leito fixo;
- Reatores com leito fluidizados gás-sólido.

1.3. VARIAÇÃO DE ESCALA

No desenvolver de um processo, quando são encontradas condições econômicas adequadas de operação em escala de bancada, as quais com frequência correspondem á obtenção de valores elevados para a produtividade e rendimento do produto de interesse, sob o ponto de vista econômico, há a necessidade de se ampliar a escala de produção até uma escala industrial (EINSELE *et al.*, 1978).

O desenvolvimento da maioria dos processos, parte de uma escala de produção menor para uma escala maior. Esta variação é denominada de aumento de escala ou “scale-up”. Quando o sentido é o inverso o chamamos de redução de escala ou “scale-dwon”.

Contudo, o estudo da variação de escala dos processos se encarrega de examinar os problemas associados com a transposição de dados obtidos em equipamentos de escalas de laboratório e piloto, para escala de produção industrial.

O desenvolvimento tradicional dos processos fermentativos é usualmente executado em três estágios ou escalas:

- Escala de bancada;
- Escala piloto;
- Escala industrial.

No trabalho colocaremos em foco os ensaios realizados em escala de bancada, tanto em microcosmos, como os efetuados em biorreatores. Por ter em vista sua maior flexibilidade e menor custo de operação, os dados básicos sobre o processo devem ser levantados dentro do maior nível de detalhes possíveis. Nessa escala são realizadas tarefas básicas, como a seleção do microrganismo e escolha das condições de temperatura, pH, umidade e nutrientes para o processo, assim como a forma de operação do biorreator e a concentração de microrganismo a ser inoculado.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a realização inicial de ensaios, empregando *A. versicolor* como agente de degradação em microcosmos, para uma posterior comparação e aumento de escala do processo de degradação de hidrocarbonetos de petróleo em biorreatores agitado e estático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ENSAIOS EM ESCALA DE BANCADA

3.1.1.MICROCOSMO

Os ensaios foram realizados em períodos de 42 dias em kitsatos de 250 mL, contendo 50 g de solo contaminado, proveniente de Guararema, SP. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 40°C, pH natural do solo de 4.76 e a 100% da CRA.

3.1.1.1.RELAÇÃO CARBONO / NITROGÊNIO

As relações C/N, utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio foram avaliadas nas seguintes proporções: 100/4.55 (relação inicial no solo); 100/10; 100/15; 100/20 e 100/25. Sendo todos os frascos acondicionados em temperatura de 40°C, 100% da CRA e pH natural do solo (pH=4,76).

3.1.1.2. TAMANHO DE INÓCULO

As porcentagem de inóculo estudadas foram: 25%; 50%; 75%; e 100% (v/v). Sendo todas as amostras submetidas a temperatura de 40°C e relação C/N de 100/25, utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

3.1.2. BIORREATOR ESTÁTICO (TIPO BANDEJA)

As condições testadas no protótipo de biorreator, do tipo bandeja, são citados a seguir, tendo sido selecionadas a partir dos resultados obtidos nos testes em microcosmos.

Os ensaios foram conduzidos num período de 42 dias, utilizando solo contaminado proveniente de Guararema, SP.

- 1 kg de solo seco, espessura da camada de solo variando entre 1.0cm e 1.5cm;
- teor inicial de umidade igual a 100% da CRA;
- pH natural do solo (pH=4.76);
- relação C/N/P = 100/10/0.0045 mantida através da adição de extrato de levedura como fonte de nitrogênio e sem alteração na concentração de fósforo;
- adição de inóculo contendo *A. versicolor*, em concentração de 50% (v/v);
- temperatura de incubação de 30°C (condicionamento em estufa).

3.1.3. PROTÓTIPO DE BIORREATOR / CETEM

As condições específicas do ensaio realizado no biorreator com agitação (Santos *et al.*, 2003) são descritas a seguir, e foram escolhidas a partir dos resultados obtidos em testes realizados em microcosmos.

Os ensaios foram realizados num período de 42 dias, utilizando solo contaminado proveniente de Guararema, SP.

- 8 kg de solo seco, correspondendo a uma taxa de ocupação de 50%;
- inicialmente com teor de umidade de 100% da CRA;
- pH natural do solo (pH=4.76);
- relação C/N/P = 100/20/0.0045 mantida através da adição de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, e sem adição de fonte de fósforo;

- adição de inóculo contendo *Aspergillus versicolor* na concentração de 25% (v/v);
- agitação intermitente em ciclos de 15 minutos a cada hora, durante 7 horas por dia e 5 dias por semana, a 12 rpm;
- aeração aplicada por 1 hora/dia, vazão de 20 L/min.

3.2. MÉTODOS ANALÍTICAS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DE TPH

A análise de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram realizadas pela Analytical Solution por cromatografia gasosa de alta resolução, conforme o método EPA 8015B. As condições de operação do cromatógrafo estão especificadas a seguir:

- cromatógrafo: Aligent 6890 series com injetor Aligent 7683 series;
- temperatura inicial = 60°C;
- rampa = 9°C/min até 310°C;
- fluxo de hélio: pressão = 6.07 psi, fluxo = 1.1 mL/min, velocidade média = 21 cm/s.

Condições do detector (FID):

- temperatura = 310°C;
- fluxo de hidrogênio gás = 35 mL/min;
- fluxo de Ar Sintético = 350 mL/min;
- fluxo de nitrogênio gás = 35 mL/min.

3.2.1. DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA POR IGNIÇÃO

A determinação de matéria orgânica foi realizada através de incineração em mufla, a 440C, por um período de 12 horas. As amostras estavam secas e devidamente maceradas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o estabelecimento de parâmetros que regulam o metabolismo fúngico foram avaliadas condições consideradas relevantes no mesmo processo biológico. Dest forma, o gráfico da Figura 1 mostra os resultados referentes às relações carbono/nitrogênio empregadas nas amostras de solo contaminado. Analisando os resultados, observamos que com o aumento da proporção de nitrogênio, em relação à amostra controle (100:4.55), houve um aumento ascendente na variável de eficiência de biodegradação. Logo, o melhor resultado foi verificado para a relação 100:25, fixando-se este parâmetro para o próximo ensaio, referente à seleção do tamanho de inóculo adequado à biorremediação.

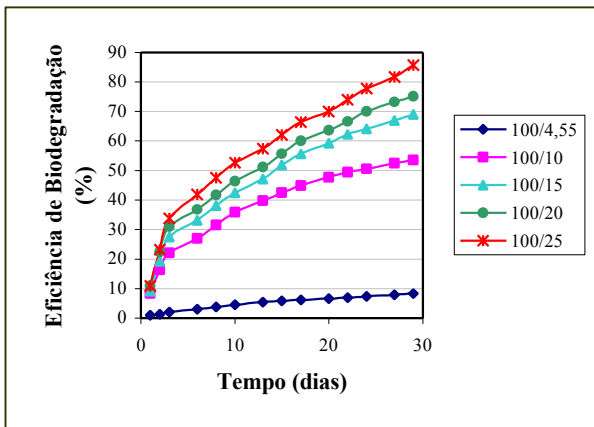


Figura 1 - Eficiência de biodegradação por *A. versicolor* utilizando relação carbono / nitrogênio (extrato de levedura como fonte de nitrogênio).

Os resultados obtidos na avaliação da influência do tamanho do inóculo de *Aspergillus versicolor*, estão apresentados na Figura 2.

Das concentrações estudadas a que apresentou um melhor resultado em eficiência de biodegradação foi a de 25% (v/v), ficando claro que o aumento da população fúngica influenciaria negativamente o processo de degradação.

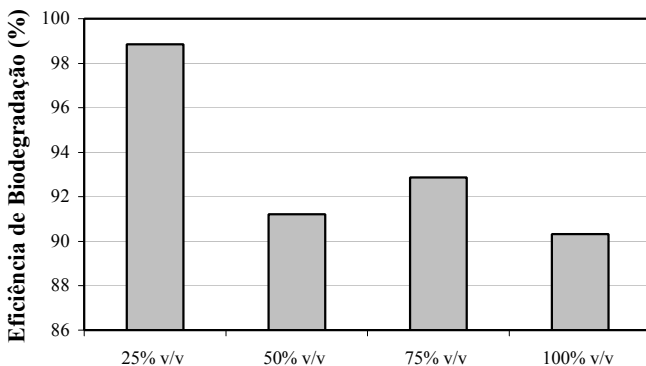


Figura 2 - Eficiência de biodegradação empregando diferentes concentrações de inóculo de *A. versicolor*.

Uma vez fixados e otimizados os parâmetros mencionados a seguir: concentração de inóculo 25% (v/v); relação carbono/nitrogênio 100:20; e temperatura de 30°C, foi realizado em seguida um teste em biorreator de bancada de eixo rotativo. Os resultados do teste estão apresentados no gráfico da Figura 3.

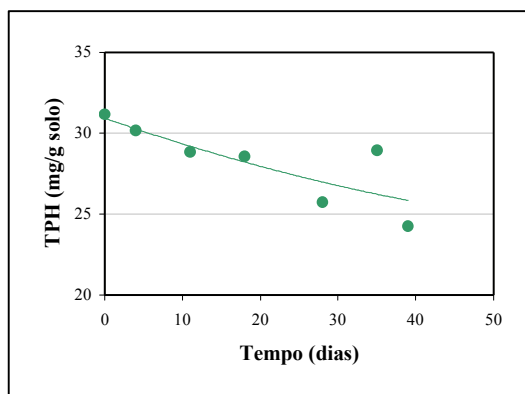


Figura 3. Monitoramento dos testes em biorreator de eixo rotativo por TPH.

Observando os resultados conseguidos através da determinação de TPH podemos constatar que os mesmos seguem uma linha de tendência que

varia na faixa de 32 mg/g de solo a 26 mg/g de solo de TPH, após decorridos 42 dias de teste. Isso implica num decréscimo de hidrocarbonetos de aproximadamente 20%.

Dando sequência à próxima etapa da pesquisa que previa a utilização de biorreatore estático, do tipo bandeja foram feitas novas avaliações dos resultados levando em consideração as análises de TPH referentes aos ensaios em microcosmos, anteriormente realizados.

Os resultados em TPH e eficiência de biodegradação para o ensaio empregando as relações de C/N, são apresentados no gráfico da Figura 4.

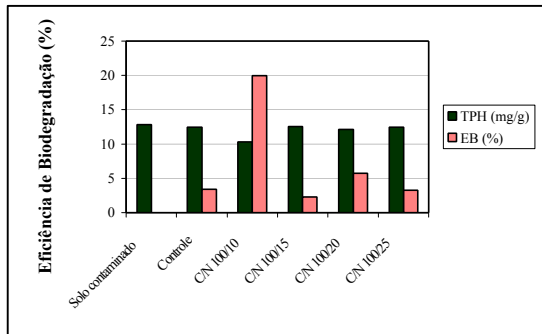


Figura 4. Biodegradação de hidrocarbonetos totais e as suas respectivas eficiências em TPH, para os experimentos avaliando as relações C/N.

Através da análise da figura acima verificamos que a relação 100:10 foi a que alcançou uma melhor eficiência de biodegradação, com um percentual em torno de 20%.

Quanto ao tamanho de inóculo (Figura 5) os resultados apontaram a concentração de 50% (v/v) como a mais adequada à biodegradação quando comparadas à de 25 e de 100% (v/v).

Dando continuidade aos experimentos foram estabelecidas as condições para o ensaio realizado em biorreator estático, usando como base os melhores resultados apontados nos gráficos das Figuras 4 e 5. Em relação à temperatura foi selecionada aquela igual a 30°C por considerar que esse valor não implicaria em acréscimos excessivos nos custos do processo de biodegradação. Embora experimentos realizados previamente tenham

conduzido a resultados inferiores em eficiência de biodegradação, quando comparados aos obtidos a 40°C.

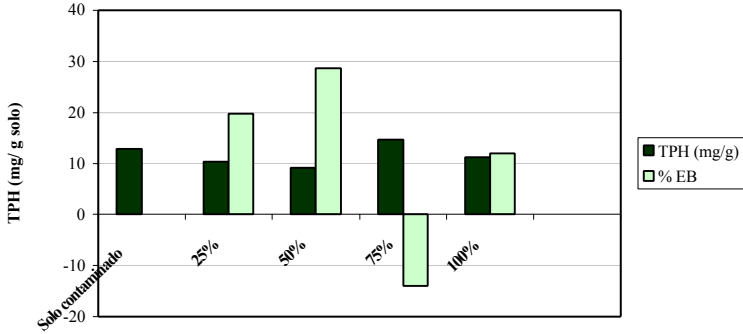


Figura 5. Biodegradação de hidrocarbonetos totais e as suas respectivas eficiências em TPH, para os experimentos avaliando o tamanho de inóculo.

O gráfico da Figura 6 representa a porcentagem de remoção de matéria orgânica obtida através de incineração das amostras a 440°C. No gráfico, ao efetuar a comparação do resultado da bandeja (20%) com o do biorreator de eixo rotativo (13%), observamos que com a utilização do reator estático os resultados apresentam um ganho de mais de 5% em remoção. Acredita-se que a movimentação possa acarretar a ruptura mecânica do micélio, interferindo no desenvolvimento dos fungos. Vale ressaltar que, o ensaio realizado em bandeja a 30°C obteve uma taxa de remoção semelhante à alcançada em microcosmos na temperatura de 40°C, que se mostrou mais favorável à degradação do que a efetuada a 30 °C, também realizada em microcosmos.

Esse resultado nos leva a pensar que o biorreator estático constitui a melhor opção para a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que potencializou a sua biodegradação, mesmo os microrganismos trabalhando em temperatura mais baixa do que a considerada adequada para o processo.

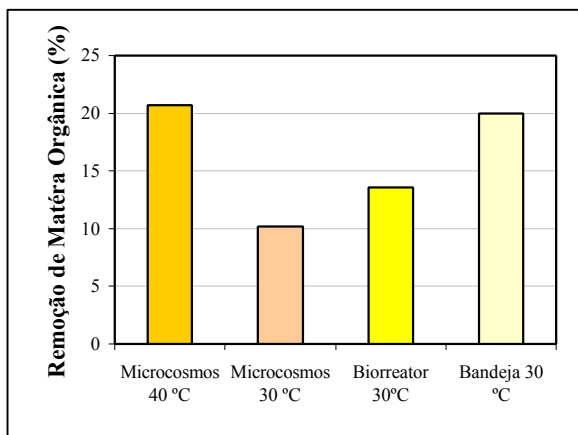


Figura 6. Remoção de matéria orgânica a 440 °C para experimentos em microcosmos, biorreator de eixo rotativo e biorreator estático.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados podemos concluir que, o processo de biorremediação utilizando fungos filamentosos deve ser levado a cabo em biorreator estático, pois foi o que mostrou uma melhor eficiência de remoção de matéria orgânica (20%), empregando as condições inicialmente selecionadas em escala de laboratório, visando sempre a viabilidade econômica da tecnologia empregada.

BIBLIOGRAFIA

- Durand, A., De La Broise, D., Blachère, H. laboratory scale bioreactor for solid state processes. *Journal of Biotechnology*, v. 8, p.59-66, 1988.
- Einsele, A. Scaling-up bioreactors. *Process Biochem.*, vol. 13, p. 13-14, 1978.
- Pandey, A., Soccol, C.R. & Mitchell, D. New development in solid state fermentation: I - bioprocesses and products. *Process Biochem.* Volume 35. Pg. 1153-1169. 2000.

- Pereira, L.T.C., Lemos, J.L.S. Os fungos filamentosos uma opção em biorremediação I. In: JIC – CETEM – 2003 – Jornada de Iniciação Científica, Rio de Janeiro(RJ). 2003.
- Santos, R. L. C., Rizzo, A. C. L., Lemos, J. L. S., Millioli, V. S., Valdman, E., Leite, S. F. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos argilosos contaminados por petróleo 6. Relatório técnico final elaborado para o CENPES/PETROBRÁS (Confidencial). Biblioteca do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, **RT2003-062-00**. 2003.