

DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO POR ASPERGILLUS NIGER E PENICILLIUM CORYLOPHILUM

Lucas Tupi Caldas Pereira

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

Judith Liliana Solorzano Lemos

Orientadora, Eng^a. Química, D. Sc.

RESUMO

No presente trabalho foram estudadas as condições de biodegradação dos fungos filamentosos *Aspergillus Niger* e *Penicillium corylophilum*, avaliando o emprego de 3 fontes de nitrogênio, bem como a capacidades de produção de tensoativos por ambos agentes biodegradadores.

Os melhores resultados de biodegradação foram obtidos com a adição de uréia, que resultou numa eficiência de biodegradação de

17,7% para o *Aspergillus Niger* e 20,1% para *Penicillium corylophilum*.

A avaliação da produção de tensoativos, realizada com inóculos fúngicos, em meio mineral, contendo óleo de soja, permitiu apontar *Penicillium corylophilum* (B 13) como aquele que apresentou um potencial para produção do referido composto, sendo o seu resultado em tensão superficial igual a 36,2mN/m.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO

O desenvolvimento crescente da sociedade moderna e contemporânea é fundamentada na exploração do petróleo. O aumento desta demanda implica no alto risco de derrames acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados.

A preocupação com o meio ambiente aumentou após os grandes derrames que causaram graves danos ao ecossistema. Em consequência, foram desenvolvidas técnicas que incluem métodos físicos, químicos e biológicos para remediar as áreas contaminadas por petróleo e seus derivados.

As técnicas que aplicam métodos biológicos são denominadas de biorremediação, que por definição é um processo que emprega microorganismos com potencial fisiológico para remoção de poluentes no solo ou outros ambientes.

A biorremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microorganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador. As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do derrame (in situ) ou fora deste (ex situ), envolvendo inúmeros procedimentos, tais como: biorremediação passiva; bioventilação; "landfarming"; compostagem; bioestimulação e bioaugmentação (MOREIRA, 2002).

1.2. FONTE DE NITROGÊNIO

A determinação da fonte de nitrogênio é essencial para o processo de biorremediação, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microorganismos. Estudos realizados com fungos mostraram que para 100 unidades de carbono degradada são necessárias, em média, de 3 a 4 unidades de nitrogênio. Das várias formas de nitrogênio encontradas na natureza, os microorganismos assimilam mais facilmente a amônia. Porém, microorganismos que possuem enzimas nitrato reductase e nitrito reductase apresentam a capacidade de assimilar, respectivamente, nitrato ou nitrito, reduzindo nitrato à nitrito, e nitrito à amônia (PUTZKE, 2002).

1.3. PRODUÇÃO DE TENSOATIVOS

Os tensoativos são moléculas anfífilas, ou seja, compostos que apresentam parte apolar (hidrófobas) e uma parte polar (hidrófila) na mesma molécula, e podem ser insolúveis e solúveis em solução aquosa. Estas moléculas agem na interface água/óleo, formando assim, micelas de formas e tamanhos diferenciados (ROCHA, 1999).

Os biosurfactantes são produzidos por microorganismos para aumentar a acessibilidade de substratos hidrófobos às células, facilitando o desenvolvimento da microbiota existente e, conseqüentemente, aumentando a biodegradação (ROCHA, 1999).

As fontes de carbono determinam o tipo e as propriedades dos biosurfactantes produzidos, sendo os hidrocarbonetos, os hidratos de carbono e os óleos vegetais os substratos mais usados para efeito de pesquisa. Dentre os biosurfatantes produzidos por bactérias, os glicolípideos são os mais frequentemente isolados e estudados. Entretanto, as referências quanto ao emprego de fungos como produtores de tensoativos são escassas, merecendo, portanto, um pouco da nossa atenção.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo realizar o tratamento ex situ de solo contaminado com petróleo, aplicando técnicas de bioaugmentação, com o auxílio de *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*, previamente selecionados para degradação do contaminante; e de Bioestimulação com adição de nitrogênio para favorecer os fungos filamentosos. Paralelamente foi avaliado o potencial de produção de tensoativos pelos respectivos fungos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

3.1.1. Amostras de solo

O solo utilizado foi o de Guararema - SP caracterizado como uma areia argilosa, contaminado em dezembro de 1998 por um derramamento de óleo cru. As amostras de solo utilizadas no desenvolvimento dos testes foram coletadas em outubro de 2001 (3ª Remessa).

3.1.2. Microorganismos

Nos ensaios de biodegradação foram empregados os fungos filamentosos *Aspergillus Niger* e *Penicillium corylophilum*, ambos previamente selecionados do solo contaminado de Guararema (1ª Remessa), SP. Os fungos foram cultivados em tubos inclinados, contendo meio Czapeck, e incubados a 30°C durante 7 dias.

3.1.3. Preparo do inóculo

Os conídeos de cada linhagem foram suspendidos em 5 mL de água destilada estéril e inoculados em frascos de 500 mL, contendo 200 mL de meio Czapeck líquido. Os frascos foram incubados a 30 °C e 150 rpm, por 5 dias, com a finalidade de formar “pellets”, os quais foram semeados em 50 g de solo contaminado a 25% (v/v).

3.1.4. FONTES DE NITROGÊNIO

Foram adicionados uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio, em duplicata, como fontes de nitrogênio, cuja relação C/N foi de 100:10. Na amostra controle não foi adicionada nenhuma fonte de nitrogênio, mas foi inoculada com fungos 25% (v/v).

3.2 BIOSURFACTANTE

3.2.1 MICROORGANISMOS

Foram avaliados o potencial de produção de tensoativos dos fungos citados no item 3.1.2, os quais foram inicialmente cultivados como especificado no referido item. Aos tubos contendo meio inclinado foram adicionados 5mL de água estéril para a obtenção de uma suspensão. Dessa suspensão foram retirados 2mL para inocular cada meio mineral, descrito a seguir.

3.2.2. PREPARO DO MEIO MINERAL

Preparou-se 100mL de cada meio, composição descrita na tabela 1, o qual adicionou-se 0.4 mL de óleo de soja, sendo em seguida esterelizado em autoclave.

3.2.3. INÓCULO

O inoculou foi preparado como descrito no item 3.2.1, sendo os frascos mantidos em incubação por uma semana para a produção do tensoativo. Após esta etapa, as amostras foram filtradas em funil de buchner, empregando papel de filtro para filtração rápida.

Tabela 1. Composições dos meios minerais para 100mL de solução

composição	MEIO 1	MEIO 2	MEIO 3
KH_2PO_4	0,5460	0,2500	XXX
Na_2HPO_4	0,4760	XXX	XXX
NH_4Cl	0,2500	0,4000	XXX
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0800	0,0600	0,0200
EL*	0,0200	XXX	XXX
CaCl_2	XXX	0,0010	XXX
NaCl	0,0100	0,0500	0,5000
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	XXX	0,0003	XXX
K_2HPO_4	XXX	XXX	0,1000
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	XXX	XXX	0,1000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	XXX	XXX	0,1000
KNO_3	XXX	XXX	0,3000

* EXTRATO DE LEVEDURA

3.2.4. ANÁLISES QUÍMICAS

As determinações de CO_2 foram realizadas de acordo como descrito em Pereira 2002. Enquanto, as análises de tensão superficial foram realizadas com as soluções na temperatura ambiente, de acordo com o descrito em Silva, 2002.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FONTES DE NITROGÊNIO

Os microorganismos mostram grande diversidade na utilização de fontes de nitrogênio, e sabe-se que o extrato de levedura, em especial, estimula o seu crescimento, em virtude desse nutriente ser uma fonte de aminoácidos e de vitaminas. Porém, apesar da sua importância como fonte de N e de outros nutrientes, deve-se ter em consideração a viabilidade econômica do processo em desenvolvimento, pois devido ao custo elevado, este nutriente afetaria consideravelmente a economicidade do processo. Para tal, torna-se indispensável a procura por outras fontes de N, que diminuam os custos de produção. As fontes inorgânicas seriam, neste caso, as mais recomendáveis,

uma vez que são as mais baratas e muito utilizadas nos processos industriais (ANTUNES, 1997).

Com o objetivo de avaliar o efeito das fontes de nitrogênio no metabolismo de *A. niger* e *P. corylophilum* foram realizados dois experimentos, onde o primeiro possibilitou a comparação biodegradadora de *A. niger*, empregando uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio, ao longo de 30 dias de monitoramento. A Figura 1 mostra esses resultados.

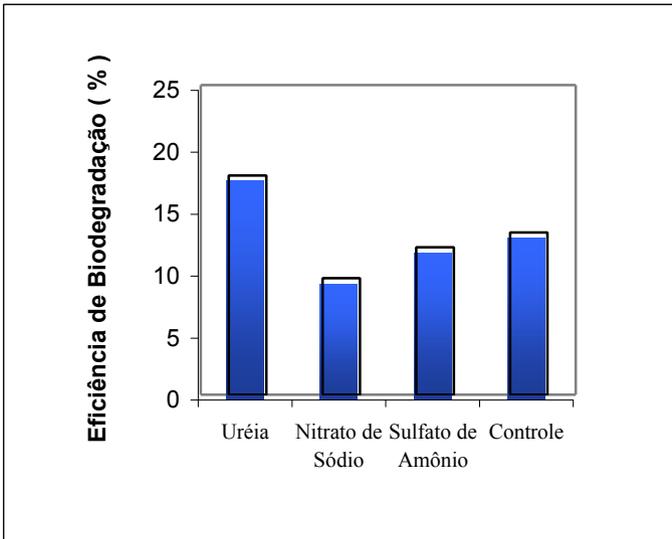


Figura 1. Biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por *A.Niger*, empregando uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio.

A análise dos resultados revela que a maior eficiência de biodegradação foi obtido com a adição de uréia(17,7%). Por outro lado, a eficiência de biodegradação, alcançada com o nitrato de sódio, 9,4%, foi inferior à conseguida com o controle (13,1%), indicando, possivelmente a ausência das enzimas nitrato e nitrito redutase nos complexos enzimáticos produzidos por *A. niger*. A amostra contendo sulfato de amônio também apresentou eficiência de biodegradação inferior à do controle, se mostrando igualmente inadequada para a remediação do solo contaminado.

Os resultados de biodegradação de *P. corylophilum* estão apresentados na Figura 2.

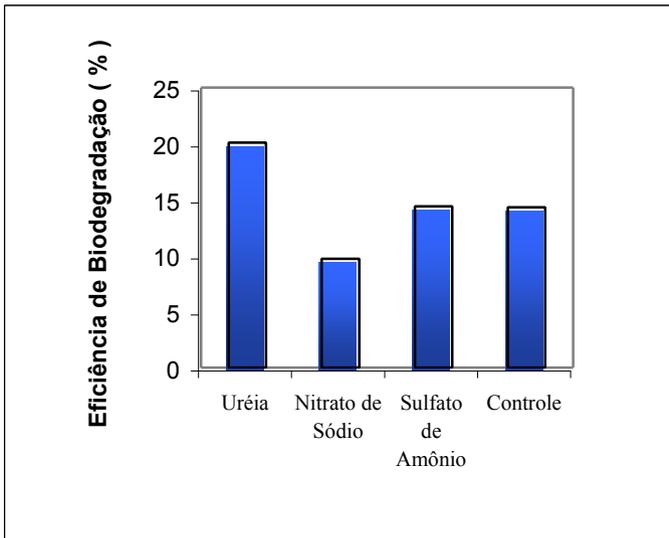


Figura 2. Biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Penicillium*, empregando uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio.

Pode ser verificado na figura acima que o melhor resultado obteve-se com a aplicação de uréia (20,1%) como fonte de nitrogênio. A eficiência de biodegradação da amostra contendo nitrato de sódio (9,7%) foi inferior à do controle (14,3%), mostrando, provavelmente, a incapacidade de produção, pelo fungo, das enzimas reductoras do mencionado composto. A amostra com sulfato de amônia (14,4%) teve eficiência de biodegradação semelhante à do controle, que foi de 14%, aproximadamente.

4.2. TENSÃO SUPERFICIAL

A análise de tensão superficial é uma análise qualitativa, que permite avaliar a produção de tensoativos através da medida da redução da tensão superficial em relação a tensão da água (70mN/m). De acordo com a literatura as tensões na faixa de 35mN/m a 40mN/m, indica que o

microorganismo é promissor na produção de biosurfactantes; abaixo de 35mN/m, indica que o microorganismo pode ser considerado um eficiente produtor (SILVA, 2002).

A tabela 2 mostra o resultado das tensões superficiais dos fungos estudados.

Tabela 2. Resultados da tensão superficial em mN/m para *A. niger* e *P. corylophilum*

FUNGOS	IDENTIFICAÇÃO	MEIO 1	MEIO 2	MEIO 3
<i>P. corylophilum</i>	B 13	36.2	44.3	42.9
<i>P. corylophilum</i>	Cz 11	56.2	49.6	41.0
<i>P. corylophilum</i>	Cz 12	53.4	57.9	51.7
<i>A. Niger</i>	S 8	51.4	41.2	53.3

O melhor resultado foi obtido com *Penicillium*-B13 (36,2mN/m), inoculado no meio 1. Este dado aponta esse fungo filamentosos como um possível produtor de tensoativos, desde que respeitadas as condições do ensaio e a composição do meio empregado. Provavelmente, a habilidade mostrada por este fungo como produtor de tensoativos contribuiu positivamente para o processo de biodegradação. As demais amostras resultaram em tensão superficial superior a 40mN/m, revelando o efeito negativo da sua produção frente ao óleo de soja. O resultado alcançado com *Penicillium*-B13, nos incentiva a buscar meios e fontes de carbono que possam estimular a produção desses tensoativos.

5. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, podemos concluir que dentre as fontes de nitrogênio avaliadas a uréia foi a que conduziu aos melhores resultados, empregando *A. niger* (17,7%) e *P. corylophilum* (20,1%) como agentes degradadores de petróleo. Quanto à produção de tensoativos *P. corylophilum* apresentou um potencial de produção promissor, sendo o seu resultado em tensão superficial igual a 36,2mN/m, o que nos leva a pensar na sua contribuição favorável ao processo de biorremediação

BIBLIOGRAFIA

- Antunes, J.G. Bioconversão de D-xilose a etanol por *Pichia stipitis*. Tese de Mestrado, Escola de Química - UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.
- Crapez, M.A.C.; Borges, A.L.N.; Bispo, M.G.S.; Pereira, D.C.; Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo, Ciência Hoje, Vol 30, N 179, 2002.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo; Editado pela UFLA, Pg 277-283, 2002.
- Putzke, J.; Putzke, M.T.L.; Reino dos Fungos, Vol 2. Editado por EDUNISC, Pg 630-632, 2002.
- Rocha, J.M.S.; Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia, Boletim de Biotecnologia nº 64, Dezembro de 1999.
- Silva, W.O.; Tapia, Y.I.P.; Produção de biosurfactantes, Desenvolvimento de bioprocessos, DEB, EQ, UFRJ, 2002.