



ARTIGO

Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação

Carla do Couto Soares Maciel^{1*}, Cynthia Silva de Souza², Pécio Alexandre da Silva³,
Maria de Fátima Vieira Queiroz de Sousa⁴ e Norma Buarque de Gusmão⁴

Recebido: 26 de setembro de 2011

Recebido após revisão: 22 de janeiro de 2013

Aceito: 14 de fevereiro de 2013

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2047>

RESUMO: (Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação). A bioestimulação consiste em uma alternativa eficaz para a potencialização da biorremediação de xenobióticos por micro-organismos. O objetivo deste estudo foi selecionar e avaliar os efeitos da bioestimulação na degradação de querosene de aviação por *Penicillium* spp. Inicialmente, o potencial de degradar o combustível foi verificado pela oxidação do corante indicador 2,6 diclorofenol-indophenol. A bioestimulação foi conduzida com 2% de querosene de aviação em meio de cultura de Bushnell Haas (BH1) e outras duas composições modificadas deste mesmo meio na relação carbono:nitrogênio 23:1 (BH2) e 47:1 (BH3). Durante 30 dias foram analisados pH, biomassa e os produtos residuais da degradação do querosene através de Cromatografia Gasosa acoplada à um Espectrômetro de Massa. *Penicillium griseofulvum* UFPEDA880 promoveu alteração do indicador após 14 horas e foi selecionado para a cinética de biodegradação e bioestimulo. A produção de biomassa ocorreu entre 0,04 g/L to 3,6 g/L e o meio de cultura BH3 favoreceu a degradação de nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e pentadecano presentes no querosene de aviação. *Penicillium griseofulvum* mostrou-se eficiente nas condições testadas, na degradação de frações alifáticas do querosene em meio de cultura BH3 sendo indicado para aplicação na degradação destes compostos.

Palavras-chave: Petroderivados, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium griseofulvum*, Hidrocarbonetos Alifáticos.

ABSTRACT: (Kinetics of degradation of jet fuel by *Penicillium* sp. by biostimulation). The biostimulation consists of an effective alternative for the enhancement of bioremediation of xenobiotics by microorganisms. The aim of this study was select and test the biostimulation effect in jet fuel degradation for *Penicillium* spp. Initially, the potential to degrade jet fuel was evaluated by oxidation of 2,6 dichlorophenol -indophenol indicator. The biostimulation was performed with 2% of jet fuel in Bushnell Haas culture medium (BH1) and other two modified composition at carbon: nitrogen 23:1 (BH2) and 47:1 (BH3). During 30 day were analyzed pH, biomass and jet fuel residual products by chromatography. *Penicillium griseofulvum* UFPEDA880 promoted change of indicator after 14 hours and was selected for kinetic biostimulation assay. Biomass production was between 0.04 g/L to 3.6 g/L and BH3 medium favored degradation of nonane, decane, undecane, dodecane, tridecane, tetradecane and pentadecane present in jet fuel. *Penicillium griseofulvum* is efficient for aliphatic jet fuel degradation when at BH3 medium, being suitable for application in degradation of these compounds.

Key words: Petroderivatives, Filamentous Fungi, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium griseofulvum*, Aliphatic Hydrocarbons.

INTRODUÇÃO

O querosene de aviação é formado por hidrocarbonetos alifáticos de nC9 a nC31 e ainda por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos- HPAs (Adebusoye *et al.* 2010). Estes compostos são tóxicos, mutagênicos e/ou cancerígenos para os seres vivos em geral (Palma-Fleming *et al.* 2012). Vários métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo desenvolvidos para remover, degradar ou imobilizar estes compostos recalcitrantes do ambiente. O uso de petroderivados como fonte de carbono para o crescimento fúngico constitui uma eficiente forma de aplicação destes micro-organismos

em processos industriais e ainda na biorremediação de ambientes contaminados. Os micro-organismos atuam degradando frações do poluente, podendo torná-lo menos tóxico que o composto original (Feng *et al.* 2007).

O potencial microbiano de degradação de xenobióticos é potencializado pela relação Carbono: nitrogênio: fósforo: enxofre. Estes compostos são essenciais ao metabolismo microbiano e cada organismo requer concentrações variadas destas relações, sendo a investigação destas condições ideais, essencial para a potencialização do processo. (Braddock *et al.* 1997, Xia *et al.* 2006). A bioestimulação pode ser aplicada *in situ* ou *ex situ* para o tratamento de resíduos e efluentes

1. Professora da Universidade de Fortaleza (Unifor). Av. Washington Soares, 1321, Edson Queiroz, CEP 60811-905, Fortaleza, CE, Brasil.
2. MsC. em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco. Instituto de Tecnologia de Pernambuco, CEP 50740-540, Recife, PE, Brasil.

3. Graduando em Engenharia Química pela Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Artur Sá, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil.

4. Professora da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: maciel.carla@gmail.com

contaminados por xenobióticos (Wilmar *et al.* 2009). O uso de *Penicillium* para degradação de querosene de aviação tem sido reportado como eficaz pelo aparato enzimático destes micro-organismos e seu potencial para a produção de biossurfactantes (Gusmão *et al.* 2008). O objetivo deste estudo foi selecionar um fungo com potencial para degradar querosene de aviação e avaliar os efeitos da bioestimulação na degradação dos hidrocarbonetos presentes no combustível testado.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Os fungos *Penicillium griseofulvum* UFPEDA 880, *Penicillium aurantiogriseum* UFPEDA 884 e *Penicillium corylophilum* UFPEDA 886 foram isolados de amostras poluídas por petroderivados e coletadas na Lagoa da Barra, próximo ao Terminal Portuário de Suape, Pernambuco, Brasil. Os fungos encontram-se preservados em meio de cultura contendo 1% de querosene de aviação e submersos em óleo mineral na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), Recife-Pernambuco, Brasil.

Amostras de Querosene de Aviação

O petroderivado utilizado foi proveniente de tanques de estocagem do Terminal Portuário de Suape, Pernambuco, Brasil. O querosene foi coletado juntamente com outros petroderivados como parte das atividades do projeto Biorremediação de Ambientes Poluídos por Petróleo e Derivados – BAPPD, vinculado à Rede Recupetro e à Companhia de Óleo Brasileiro (Petrobras S.A.). Análises do Total de Hidrocarbonetos de Petróleo (TPH) do querosene revelaram um perfil de alifáticos de cadeias nC9 a nC31, com predominância de nC11 a nC17 e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH) detectados em nível de traços (GOMES *et al.* 2009). As amostras do combustível foram duplamente filtradas em filtro milipore e conservadas sob refrigeração.

Verificação do Potencial de Degradação

Um ensaio preliminar para investigar o potencial de degradação de querosene de aviação pelos micro-organismos foi conduzido de acordo com Hanson *et al.* (1993), utilizando-se o indicador redox 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP). Os fungos foram preparados previamente obedecendo a jejum severo, pela redução da disponibilidade de glicose. Nos poços das placas multipoços de poliestireno foram adicionados 80 µL de indicador redox, 200 µL de suspensão fúngica (10^7 conídios/mL) e volumes distintos em poços diferentes com querosene de aviação 50 µL (2,5%) ou 200 µL (10%), e meio de cultura Bushnell Haas: 1,70 mL ou 1,50 mL de acordo com a concentração de querosene utilizada (v/v). Todas as placas foram incubadas por 120 horas a $30\text{ °C} \pm 2$, protegidas da luz. Após o período de incubação foi possível verificar a habilidade microbiana de biodegradar o combustível, evidenciada indiretamente

através da modificação da cor do indicador de azul para incolor. Como controle utilizou-se meio Bushnell Haas contendo querosene e o indicador DCPIP, sem inoculo.

Cinética de Degradação Durante a Bioestimulação

A cinética foi conduzida por 30 dias e a relação tempo x hidrocarbonetos alifáticos residuais provenientes da biodegradação foi estabelecida. A biodegradação do querosene de aviação foi conduzida através da bioestimulação do fungo à diferentes relações Carbono: Nitrogênio. Aliquotas de 10^7 conídios/mL (2,5 mL) foram transferidas para meio de cultura (45 mL) contendo 5% do combustível como exclusiva fonte de carbono e três composições distintas do meio de cultura Bushnell Haas. O primeiro meio sem alterações na composição de nitrogênio - BH1, de acordo com Atlas (1995): (MgSO₄·7H₂O, 0,20 g; KH₂PO₄, 1,00 g; K₂HPO₄, 1,00 g, NH₄NO₃, 1,00 g; FeCl₃, 0,05 g, CaCl₂, 0,02 g). Os outros meios de cultura tiveram modificações na relação carbono: nitrogênio: BH2-50:1 (1,595 g de NH₄NO₃) e BH3-100:1 (2,28 g de NH₄NO₃). O material foi incubado sob agitação a 150 RPM e $30\text{ °C} \pm 2$.

A cada 24 horas amostras foram retiradas e os hidrocarbonetos alifáticos residuais foram analisados, por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa (GC-MS), a fim de se estabelecer a cinética e ainda o Potencial Hidrogeniônico, através de potenciômetro e Biomassa por gravimetria e posterior secagem.

Deteção de hidrocarbonetos alifáticos através de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa

Os hidrocarbonetos foram detectados de acordo com o protocolo EPA 8015c, utilizado para detecção destes compostos em diesel, gasolina e querosene. As amostras foram extraídas com diclorometano e a fase oleosa foi separada e injetada (1µL) no GC-MS. Uma coluna DB - 5ms (5% difenil e 95% dimethylpolysiloxane) com dimensões: 0,25 mm x 30 µm x 0,25 µm foi utilizada. O hélio foi o gás de arraste utilizado a uma vazão de 39.5 cm/seg. e a temperatura variou linearmente de 40 °C por 4 minutos a 290 °C por 8 minutos, com aquecimento de 4 °C min.⁻¹. O espectrômetro de massa com detector de ionização elétrica do tipo multiplicador de elétrons secundários (EV70) foi operado com uma temperatura da fonte de íons de 290 °C e digitalização de 35=500m/Z. A identificação de hidrocarbonetos alifáticos foi feita por comparação dos espectros de massa dos constituintes do combustível com a biblioteca de compostos Wiley™. Para a análise foi avaliado o decaimento dos picos de concentração dos componentes do combustível pelo tempo de retenção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três fungos promoveram a oxidação do DCPIP, que ocorreu após 14 horas para *P. griseofulvum* UFPEDA880, 20 horas para *P. aurantiogriseum* –UFPEDA884 e 25 horas para *P. Corylophilum*- UFPEDA 886. O *P. griseofulvum* foi selecionado como a estirpe de *Pe-*

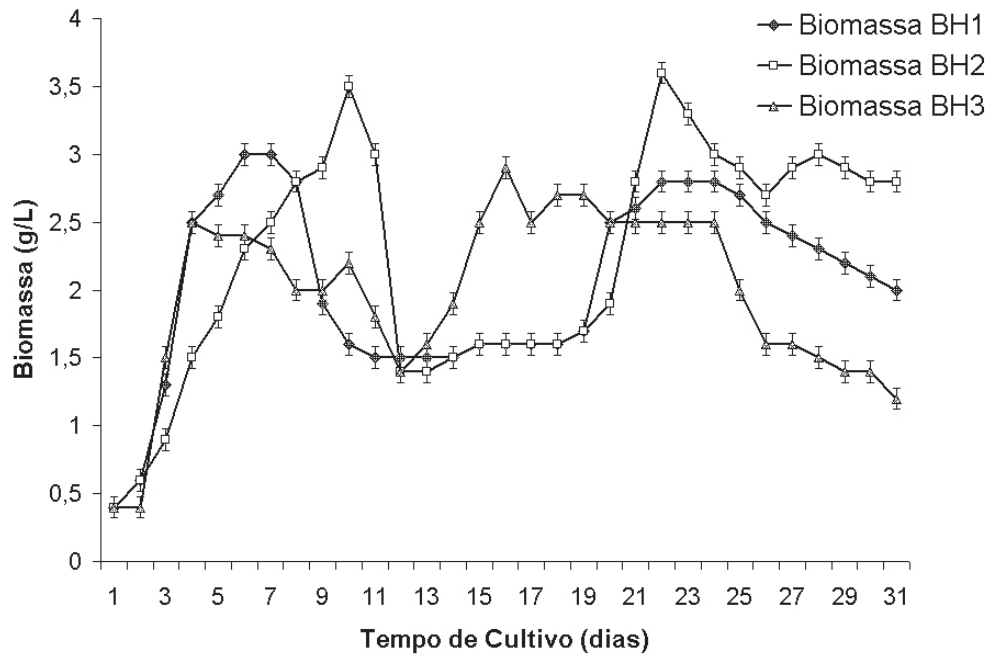


Figura 1. Cinética da produção de biomassa por *Penicillium griseofulvum* em meios de cultura BH1, BH2 e BH3.

nicillium com maior potencial de biodegradação de querosene de aviação, dentre as três testadas. Miranda *et al.* (2007) utilizando óleo diesel como substrato para o cultivo da levedura *Rhodotorula aurantiaca*- UFPE-DA845 verificaram a descoloração do corante após 16 horas, enquanto que estudos de Hanson *et al.*, (1993) revelaram bactérias capazes de oxidar o DCPIP a partir de substratos oleosos após 12 a 24 horas de incubação.

Na cinética de biodegradação do querosene, verificou-

-se que *P. griseofulvum* UFPEDA 880 demonstrou grande adaptação à fonte de carbono xenobiótica utilizada, devido aos índices da curva de crescimento (Fig. 1). Além disso, foram identificados até sete picos cromatográficos resultantes da degradação de n-alcenos: nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano e pentadecano durante o processo de biodegradação. A oxidação terminal de n-alcenos por *Penicillium* spp. foi descrita anteriormente e leva à formação de compostos mais

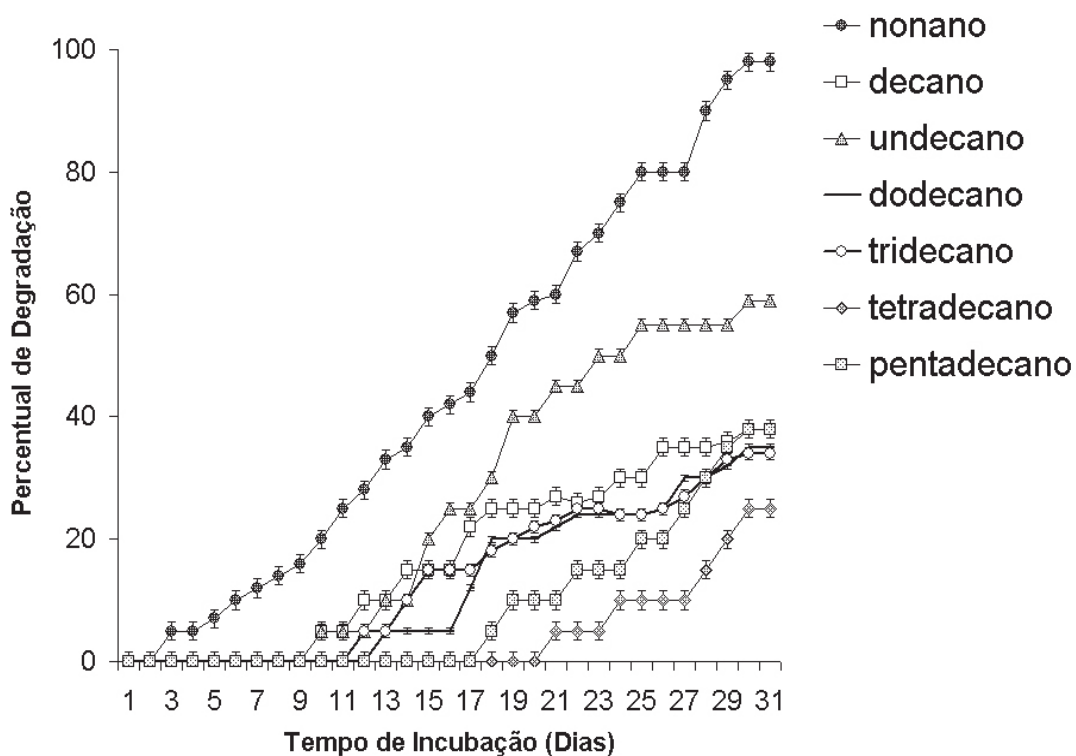


Figura 2. Degradação dos hidrocarbonetos alifáticos do querosene por *Penicillium griseofulvum*-UFPEDA880, em meio BH3.

estáveis como alcoóis, cetonas e ésteres intermediários (Monfort *et al.* 1990, San Martin 2011).

No meio de cultura BH3, cuja relação carbono: nitrogênio foi de 47:1, ocorreu a degradação de sete hidrocarbonetos saturados. Os maiores percentuais de degradação destes hidrocarbonetos ocorreram com 29 dias de processo: 93% de degradação de nonano, 57% de undecano, 40% de penta e tridecano, 33% para decano e dodecano e 22% para tetradecano (Fig. 2). O estudo desta relação entre carbono e nitrogênio é essencial para a potencialização da biodegradação, sendo as relações carbono: nitrogênio 33:1 e 25:1 já citadas anteriormente como eficientes em processos de biodegradação de xenobióticos por outros micro-organismos (Putzke *et al.* 2002).

Nas demais composições de meio de cultura utilizadas, BH1 e BH2, ocorreu degradação de compostos mais leves como nonano e decano. Rocha *et al.* (2011) relacionaram a degradação de alcanos com a produção de biossurfactantes e esta mesma estirpe de *P. griseofulvum* UFPEDA880, foi relatada anteriormente como produtora destes agentes tensoativos (Gusmão *et al.* 2008).

Os valores de pH verificados durante a cinética oscilaram de neutro à ácido (2.0 a 6.8) para os três meios de cultura. Esta acidez do meio em processos de biodegradação ocorre devido aos produtos intermediários gerados durante o catabolismo como os ácidos orgânicos. De acordo com vários autores, os índices de pH mais favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos na degradação de petroderivados é entre 6.0 a 8.0 e os fungos filamentosos podem promover a acidificação ainda maior do meio de cultivo, corroborando com os resultados obtidos (Wilmar *et al.* 2009, Chen *et al.* 2006, Leahy & Colwell 1990).

CONCLUSÕES

Os fungos *Penicillium sp.* testados demonstraram potencial em degradar o querosene de aviação, havendo destaque para *Penicillium griseofulvum* pelo curto tempo de degradação. Este fungo é considerado eficiente na degradação de hidrocarbonetos alifáticos (nC9 a nC15) do querosene em meio de cultura modificado pela relação carbono: nitrogênio de 47:1, sendo indicado para aplicação na degradação destes compostos em processos de biorremediação *ex situ*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à FINEP/PE-TROBRAS, pelo apoio para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ADEBUSOYE, A.S., ILORI, M.O., OBAYORI, O.S., OYETIBO, G.O., AKINDELE, K.A.M. & AMUND, O.O. 2010. Efficiency of cassava steep liquor for bioremediation of diesel oil-contaminated tropical agricultural soil. *Environmentalist*, 30: 24-34.

ATLAS, R.M. 1995. *Handbook of media for environmental microbiol-*

ogy. New York: Ed. CRC Press. p. 489-491.

BRADDOCK, J.F., RUTH, M.L., CATTERALL, P.H., WALWORTH, J.L. & MCCARTHY, K.A. 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils: implications for nutrient-amended bioremediation. *Environmental Science and Technology*, 31: 2078-2084.

CHEN, H.J., GUO, G.L., TSENG, D.H., CHENG C.L. & HUANG, S.L. 2006. Growth factors, kinetics and biodegradation mechanism associated with *Pseudomonas nitroreducens* TX1 grown on octylphenol polyethoxylates. *J. Environ. Manage.*, 80: 279-286.

FENG, Q.X., MA, X.P., ZHOU, L.H., SHAO, D.B., WANG, X.L. & QIN, B.Y. 2007. EOR pilot tests with modified enzyme in China. *SPE Europec/EAGE Annual Conference and Exhibition held in London, United Kingdom, 06/11-14*. Disponível em <<http://biocor.ca/documents/SPE-107128-MS-P%5B2%5D.pdf>>

GOMES, E.B., SORIANO, A.U., MIRANDA, R.C.M., SOUZA, M.F.V.Q. & PEREIRA JR., N. 2009. Biodegradation of stored Jet fuel by a *Nocardia* sp. Isolated from contaminated soil. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 52(5): 1279-1284.

GUSMÃO, N. B., SILVA, R., MACIEL, C. C. S., SOUZA, C. S., VANCE-HARROP, M. H., NASCIMENTO, A. E. & SOUZA, M. F. V. Q. 2008. Biosurfactant production by fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62: 2-20. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.02.002>>.

HANSON, K.G., DESAI, D. & DESAI, A.J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Techn.*, 7: 745-748.

LEAHY, J.G. & COLWELL, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3): 305-315.

MIRANDA, R.C.M., SOUZA, C.S., GOMES, E.B., LOVAGLIO, R.B., LOPES, C.E. & SOUSA, M. F. V. Q. 2007. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco - Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1): 147-152.

MOUNFORT, D.O., PYBUS, V. & WILSON, R. 1990. Metal ion-mediated accumulation of alcohols during alkane oxidation by whole cells of *Methylosinus trichosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12(5): 343-348.

PALMA-FLEMING, H., QUIROZ, R.E., CAMPILLAY, C., FIGUEROA, M., VARAS, A., VELÁSQUEZ, D. & PALMA-LARREA, B.J.X. 2012. Temporal and spatial trends of total aliphatic hydrocarbons of diesel range and trace elements in sediments and mussel of the corral bay area, Valdivia, South Central Chile. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57(2): 1074-1082.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M.T.L. 2002. *Reino dos Fungos*. Vol 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 606 p.

ROCHA, C.A., PEDREGOSA, A.M. & LABORDA, F. 2011. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55959. *AMB express*, 27(1): 1-9.

SAN MARTÍN, Y.B. 2011. Bioremediation: a tool for the management of oil polluton in marine ecosystems. *Biociencia aplicada*, 28(2): 69-76.

SUDIP, K.S., OM, V.S. & RAKESH, K.J. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6): 243-248.

WILMAR, G., JAIR, G. & SANTIAGO, C. 2009. Evaluation de la bioestimulación frente a la atenuación natural y La bioaumentación em um suelo contaminado com uma mezcla de gasolina-diesel. *Dyna*, 76(160): 83-93.

XIA, W.X., LI, J.C., ZHENG, X.L., BI, X.J. & SHAO, J.L.. 2006. Enhanced biodegradation of diesel oil in seawater supplemented with nutrients. *Engineering in Life Sciences*, 6: 80-85.