

DEGRADAÇÃO DE FENOL POR *Aspergillus niger* AN400 EM REATORES EM BATELADA

Zuleika BEZERRA PINHEIRO(1); Eloiza PINHEIRO DAMASCENO (2); Germana MARIA MARINHO SILVA (3); Kelly RODRIGUES (4); Glória MARIA MARINHO SILVA SAMPAIO (5)

- (1) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará Rua 20, 31 – Pequeno Mondubim – Fortaleza – CE – CEP: 60761-170 – Brasil – Tel: (85) 3473-0233 – e-mail: zuleikabpinheiro@bol.com
(2) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará, eloizapd@hotmail.com
(3) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará, germana@cefetce.br
(4) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará, kelly@cefetce.br
(5) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará, gloriamarinho@cefetce.br

RESUMO

A presença de fenol em efluentes industriais acarreta problemas ambientais devido às suas características ácidas, tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Pelo fato deste composto ser de difícil degradação, pesquisas vêm sendo realizadas em busca de um meio viável de removê-lo do meio ambiente. A produção de enzimas extracelulares pelos fungos, torna viável a sua utilização em processos de tratamento biológico. Isto posto, o presente trabalho propõe estudar a capacidade de degradação de Fenol de um efluente sintético em reatores em batelada, sem aeração artificial e sem agitação, inoculados com fungos da linhagem *Aspergillus niger* AN400 e utilizando o açúcar refinado como fonte primária de carbono. Para este estudo foram utilizadas quatro diferentes concentrações de fenol (1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L e 100 mg/L), divididas em três lotes: C, contendo apenas efluente sintético; FF, contendo efluente sintético e fungo; FFA, contendo efluente sintético, fungo e açúcar refinado. O Experimento foi conduzido por um período de cinco dias, sendo retiradas alíquotas a cada 24 horas. Os resultados do experimento mostraram que houve eficiência na remoção de fenol de, aproximadamente 100%, a partir do terceiro dia de tratamento. Portanto, o emprego da espécie *Aspergillus niger* AN 400 aponta para uma tecnologia viável para tratamento de efluentes com elevada concentração de fenol.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger* AN 400, reatores em batelada, fenol, tratamento biológico.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos estão presentes em águas residuárias de inúmeras indústrias, incluindo refinaria de petróleo, têxteis, manufatura de plásticos, resinas, ferro, aço, produção de azeite de oliva, beneficiamento de castanha de caju, etc. Tais compostos podem ser tóxicos a algumas espécies aquáticas e ocasionar problema de gosto e odor no processo de cloração em águas de abastecimento, mesmo quando estão em baixas concentrações (1 a 10 µg/L) (ARANÃ *et al.* 2001). Além disso, acarreta uma grande ameaça para o meio ambiente devido as suas características ácidas, tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, mostrando assim a grande necessidade de remoção destes compostos das águas residuárias.

Vem crescendo a busca na prática da remoção deste tipo de composto recalcitrante do ambiente. A atividade microbiana destaca-se como importante fator na eliminação de poluentes químicos. Os fungos têm sido amplamente empregados em processos biológicos para remoção de compostos de difícil degradação, como os fenóis, pois são capazes de reciclar compostos como lignina, celulose, quitina, melanina e queratina, além de serem altamente versáteis no metabolismo de xenobióticos (PRENAFETA BOLDU, 2002), pois produzem enzimas extracelulares que quebram moléculas complexas e as tornam assimiláveis ao seu metabolismo. Esta atividade pode ser intensificada com a adição de um substrato primário, facilmente assimilável, como a glicose (GRIFFIN, 1994; ASSADI e JAHANGIRI, 2000).

A espécie estudada nesta pesquisa foi *Aspergillus niger*, que possui uma grande eficiência comprovada, para degradação de compostos recalcitrantes e remoção de DQO (MIRANDA *et al.* 1996; VASSILEV *et al.* 1997; GARCÍA *et al.* 2000; RODRIGUES, 2006).

Tendo em vista a necessidade da criação de novas tecnologias voltadas para a otimização dos processos de tratamento dos diferentes tipos de efluentes, e em especial os que contém compostos persistentes, o emprego de reatores biológicos com fungos pode ser apontado como uma alternativa. Esta pesquisa tem como objetivo remover fenol empregando reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger* AN 400.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo e produção dos esporos de *Aspergillus niger* AN400

Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram cultivados, em placas de Petri estéreis, no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do CEFETCE, 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.

2.2 Contagem dos esporos

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 ($2,9 \times 10^9$ esporos/mL), foram calculados os volumes a serem adicionados aos reatores, na concentração de 2×10^6 esporos /mL.

2.3 Água residuária

A água residuária sintética utilizada foi preparada com água destilada, adicionada de 1mL/L de Vischiniac (solução de nutrientes), 50 mg/L de cloranfenicol e fenol nas seguintes concentrações: 1000 mg/L; 500 mg/L; 250 mg/L e 100 mg/L.

2.4 Reatores em batelada

Foram usados 24 reatores constituídos de frascos cilíndricos em vidro, com tampa rosqueável e com volume total de 2,5 L, os quais foram previamente desinfetados com ácido clorídrico 3M.

Para cada uma das 4 concentrações de fenol estudadas (1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L e 100 mg/L) formou-se um grupo de reatores composto por: 6 de controle (C), contendo apenas a efluente sintético; 6 com efluente sintético e fungos (FF) e 6 com efluente sintético, fungos e 0,5g/L de açúcar refinado (FFA).

De acordo com o tempo de reação foram retiradas alíquotas (120 mL) dos reatores para a determinação das variáveis. Na Tabela 1 são mostrados os tempos de reação para as retiradas das alíquotas realizadas em cada um dos grupos.

Tabela 1: Cronograma geral de operação dos reatores em batelada distribuídos em cada grupo em função da concentração de fenol.

Tempo de reação (dia)	Controle	Reatores com Fungos	
		F	FG
1	AC ₁	AFF ₁	AFFA ₁
2	AC ₂	AFF ₂	AFFA ₂
3	AC ₃	AFF ₃	AFFA ₃
4	AC ₄	AFF ₄	AFFA ₄
5	AC ₅	AFF ₅	AFFA ₅

ACn*: retirada de alíquota do reator C

AFFn*: retirada de alíquota do reator FF

AFFAn*: retirada de alíquota do reator FFA

*Volume retirado no tempo de reação

2.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas foram: DQO, fenóis e pH, executadas de acordo com APHA (1998), exceto fenóis, cuja determinação foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Merk (1975).

3. RESULTADOS

A eficiência de remoção de fenol, crescimento da biomassa fúngica e variação do pH para os reatores de controle, FF e FFA estão apresentados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

3.1 Variação do Ph

Os valores de pH, nos reatores de controle, permaneceram entre 6 e 7, e nos reatores FF e FFA variaram entre 4 e 7 como mostrado nas Figuras 1, 2, 3 e 4, nas concentrações de fenol de 1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L e 100 mg/L, respectivamente. Segundo Wheller *et al.* (1991), o gênero *Aspergillus niger* desenvolve-se bem em faixas de pH variando entre 3,30 e 7,50, como verificado nesta pesquisa. Em outras pesquisas, como em Oliveira *et al.* (2006) e Félix *et al.* (2006), o pH foi ajustado artificialmente no início do experimento a uma faixa propícia para o crescimento do fungo que é em torno de 4 a 5. Neste experimento, optou-se em não realizar o ajuste do pH, para avaliar a eficiência do fungo sob condições naturais para esta variável, assim diminuindo os custos do tratamento. Os reatores FF e FFA apresentaram diminuição do valor do pH, possivelmente em função dos fungos que, ao degradar os compostos contidos na água produzem ácidos.

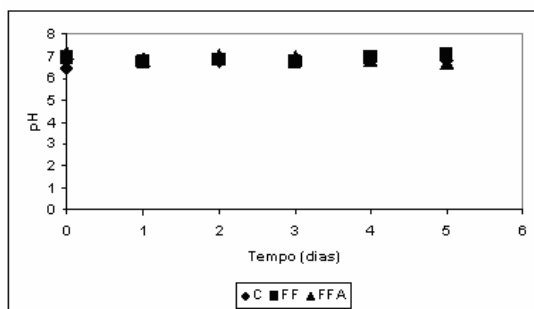


Figura 1 – Variação do pH em reatores na concentração de 1000 mg/L

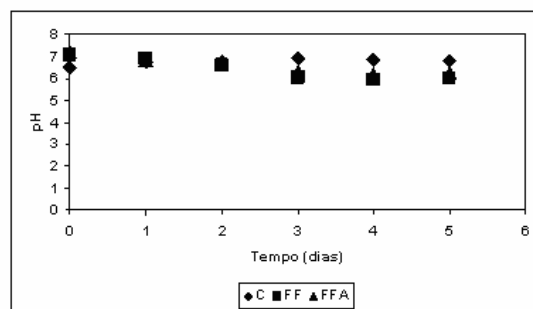


Figura 2 – Variação do pH em reatores na concentração de 500 mg/L

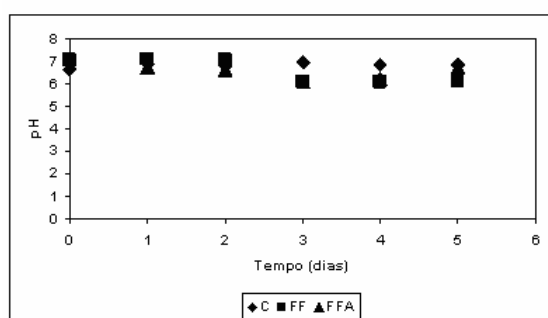


Figura 3 – Variação do pH em reatores na concentração de 250 mg/L

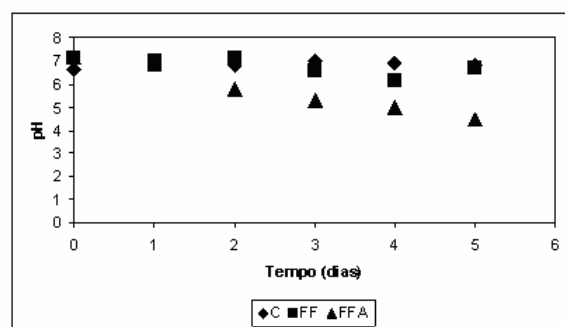


Figura 4 – Variação do pH em reatores na concentração de 100 mg/L

3.2 Variação de Fenol

O fenol é um composto pouco solúvel em água e com cheiro forte característico, (HOLUM, 1994). Podem ser tóxicos, carcinogênicos e alergogênicos e, devido a esses efeitos, sua determinação e remoção do meio ambiente é de tamanha importância (TIMUR et al. 2004). Diversas pesquisas são direcionadas para a remoção desse composto em diferentes tipos de efluentes e variadas formas de tratamento, com obtenção de bons resultados, como é o caso de alguns trabalhos com efluente de indústria petrolífera, chegando a 75% de remoção de fenol em reatores de leito fixo e fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* (FELIX et al. 2006), indústria de óleo de oliva, obtendo 88%, sob agitação de 180 rpm e *Panus tigrinus* como inóculo fúngico, e 90% de remoção de fenol em regime de batelada utilizando *Phanerochaete chrysosporium* (D'ANIBALLE et al. 2004; DIAS et al. 2003) e indústria de açúcar, com uma remoção de 66% (GARCIA et al. 1997). Os resultados desta pesquisa, quanto à degradação de fenol, nos reatores FF e FFA, mostraram que houve uma maior remoção a partir do 3º dia de operação, principalmente para os reatores FFA, com valores constantes, e com uma remoção próxima a 100%. Houve também uma diminuição de fenol nos reatores de Controle, possivelmente, porque os mesmos foram contaminados por outros microrganismos, conforme mostrado nas Figuras 5, 6, 7 e 8. Comparando os resultados desta pesquisa com os de Rodrigues (2006), que trabalhou em condições similares as deste experimento, com a diferença que a glicose foi utilizada como fonte primária de carbono, e neste trabalho foi utilizado o açúcar refinado, verificou-se que os resultados obtidos nesta pesquisa assemelham-se aos de Rodrigues (2006), em que o fenol também começou a ser removido a partir do 3º dia de operação, com valores de remoção desta variável chegando a 100%. Segundo a autora, isso ocorreu, possivelmente, pelo esgotamento da fonte primária de carbono, fazendo com que o fungo assimilasse o fenol como substrato, com maior velocidade de consumo. De acordo com os resultados citados, verificou-se que o uso do açúcar refinado como fonte primária de carbono possui eficiência similar ao uso de glicose, para este fim. Fornecendo desta forma um menor custo para a pesquisa.

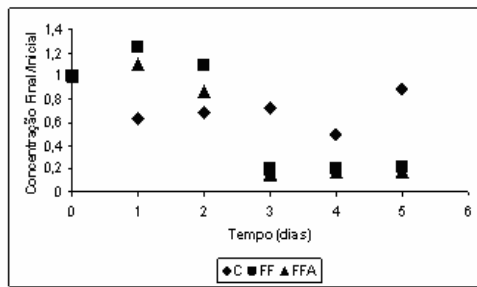


Figura 5 – Variação do fenol em reatores na concentração de 1000 mg/L

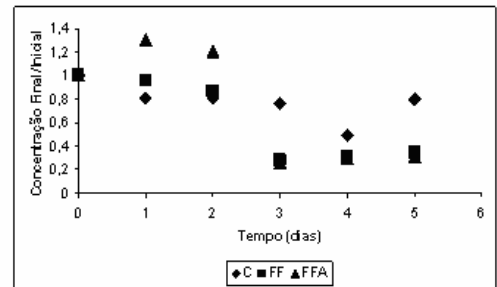


Figura 6 – Variação do fenol em reatores na concentração de 500 mg/L

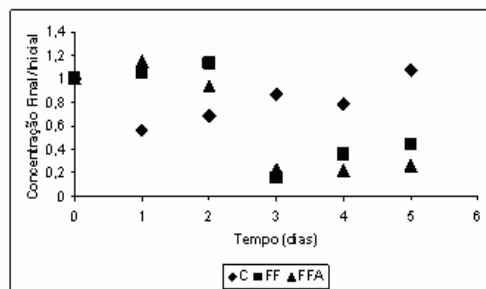


Figura 7 – Variação do fenol em reatores na concentração de 250 mg/L

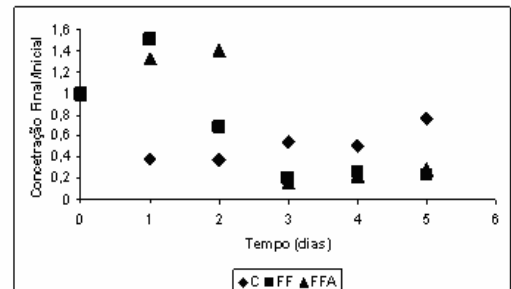


Figura 8 – Variação do fenol em reatores na concentração de 100 mg/L

3.3 Variação de SSV

Houve um crescimento da biomassa fúngica nos reatores FF e FFA em todas as concentrações testadas (Figuras 9, 10, 11, 12), mostrando a boa adaptação dos fungos ao meio. Pôde-se observar que nas concentrações de 250 mg/L e 100 mg/L de fenol, esse crescimento foi mais acentuado, devendo-se ao fato de que, possivelmente, as altas concentrações de fenol inibiram o pleno desenvolvimento do fungo. Através do aumento dos resultados de SSV nos reatores de Controle, observou-se que houve um crescimento de biomassa mínimo, indicando que esses reatores possivelmente foram contaminados por outros microrganismos.

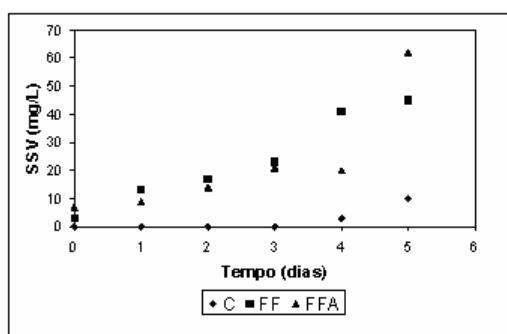


Figura 9 – Variação SSV em reatores na concentração de 1000 mg/L

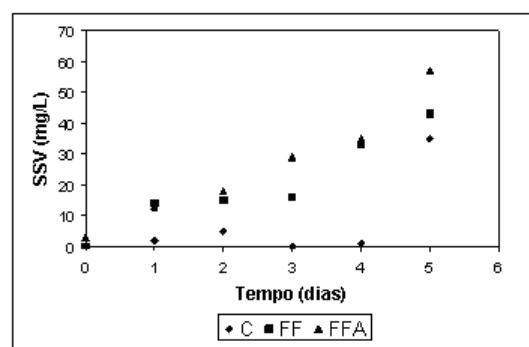


Figura 10 – Variação SSV em reatores na concentração de 500 mg/L

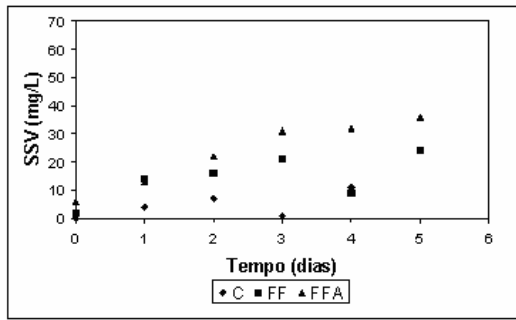


Figura 11 – Variação SSV em reatores na concentração de 250 mg/L

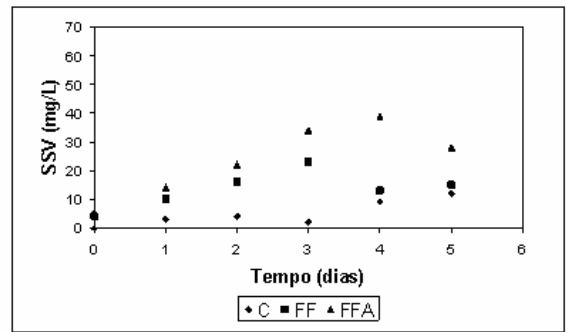


Figura 12 – Variação SSV em reatores na concentração de 100 mg/L

3.4 Remoção de DQO

Os resultados de DQO mostraram que a eficiência de remoção de matéria orgânica nos reatores FFA 36% foi menor que nos reatores FF 86% mostrados nas Figuras 13, 14 15 e 16, diferentemente de outros trabalhos da literatura, quando comparou-se o tratamento de águas residuárias com e sem a adição de glicose, usada como substrato primário, onde a biodegradação de matéria orgânica foi mais eficiente quando do uso deste co-substrato, como os de Rodrigues (2006), que alcançou uma remoção para reatores sem glicose e com glicose de 27% e 100%, respectivamente, e os de Félix (2006) atingindo valores de remoção em reatores com glicose e sem glicose de 59 e 82%, respectivamente.

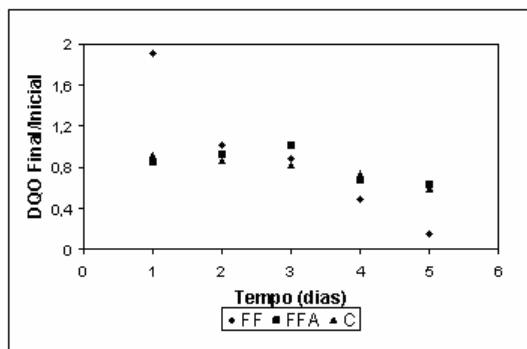


Figura 13 – Variação DQO em reatores na concentração de 1000 mg/L

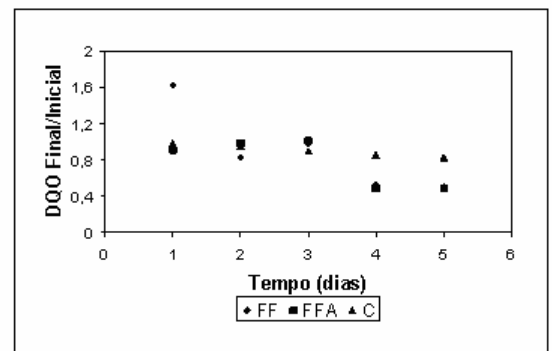


Figura 14 – Variação DQO em reatores na concentração de 500 mg/L

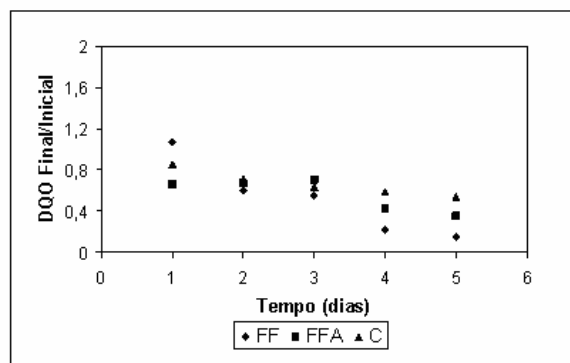


Figura 15 – Variação DQO em reatores na concentração de 250 mg/L

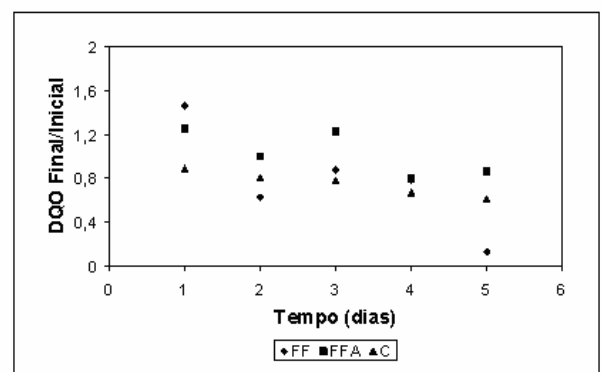


Figura 16 – Variação DQO em reatores na concentração de 100 mg/L

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que o *Aspergillus niger* AN400 para a remoção de fenol foi eficiente em concentrações de até 1000 mg/L, chegando a 100% de remoção no 3º dia, e que o açúcar refinado pode ser empregado como co-substrato para remoção de fenol, em substituição à glicose, representando uma minimização dos custos com a fonte primária de carbono.

A falta de aeração artificial não comprometeu a eficiência de remoção de fenol nos reatores com e sem açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA – AWWA – WEF Standard methods for the examination of water and wastewater 19th, Washington DC, USA, 1999.
2. ARAÑA, J. et al. Highly concentrated phenolic wastewater treatment by the Photo-Fenton reaction, mechanism study by FTIR-ATR. Chemosphere. V. 44, p.1017-1023. 2001.
3. ASSADI, M.M.; JAHANGIRI, M. R. Textile wastewater treatment by *Aspergillus niger*. Desalination. V. 141, p. 1-6. 2001.
4. D'ANNIBALE, A. et al. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load, from olive mill wastewater. Research in Microbiology. V.155, p.596 – 603. 2004.
5. DIAS, A. A. et al.. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. Bioresource Technology. V. 92, p. 7–13. 2004.
6. FELIX, J.P.L. et al. Remoção de DQO e Fenóis totais presentes em efluentes de indústria petrolífera utilizando reatores de leito fixo e fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* AN400. 1ª coletânea de trabalhos técnicos – Reline. p. 183-198. 2006.
7. GARCIA, G. et al.. Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. Wat. Res. V. 31, n 8 p. 2005-2011. 1997.
8. GARCIA, G. et al.. Removal of phenol compounds from olive Mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. Process Biochemistry. V. 38, p. 915-920. 2003.
9. GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology. 2. ed. New York: Wiley-Liss, p. 458. 1994.
10. HOLM, J. R. Fundamentals of general organic and biological chemistry. John Wiley & Sons, ins. 1994.
11. MERCK DARMSTADT. The testing of water, 9th edition. P. 161-166. Germany, 1972.
12. MIRANDA, M. P. et al.. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. V. 57, p. 229-235. 1996.
13. OLIVEIRA, E.C. et al. Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. 1ª coletânea de trabalhos técnicos – Reline, p. 134 -148. 2006.
14. PRENAFETA BOLDÚ, F. X. Growth of on aromatic hydrocarbons: Environmental technology perspectives. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2002.
15. RODRIGUES, K. de A. Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética. São Carlos, 2006. Tese de doutorado-Escola de engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. 2006
16. VASSILEV, et al.. Olive mill waste water treatment by immobilized cell of *Aspergillus niger* and its enrichment with soluble phosphate. Process Biochemistry. V. 32, n 7, p. 617-620. 1997.
17. WHEELER, K.A. et al. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology. N. 12. p. 141-150. 1991.