

AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE FENOL NA PRESENÇA DE CO-SUBSTRATOS POR *Aspergillus niger*

Marcus ANDRADE (1); Lylyanne NOGUEIRA (2); Karine ALCANTARA (3); Thiago SOUZA (4); Glória MARINHO (5); Kelly Rodrigues (6)

- (1) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará (CEFET-CE), e-mail: marcusviniciusan@gmail.com
(2) CEFET-CE, e-mail: lylyannenogueira@gmail.com
(3) CEFET-CE, e-mail: kelly@cefetce.br
(4) CEFET-CE, e-mail: thiagosnips@hotmail.com
(5) CEFET-CE, e-mail: gloriamarinho@cefetce.br
(6) CEFET-CE, e-mail: kelly@cefetce.br

RESUMO

O fenol é um composto presente nas águas residuárias de várias indústrias, principalmente nas petroquímicas, farmacêutica, de beneficiamento da castanha de caju, entre outros. É um composto recalcitrante de grande toxicidade para os organismos e possui características carcinogênicas e mutagênicas, sendo sua disposição indevida no meio ambiente causador de grandes impactos ambientais, o que torna de grande importância o seu tratamento. 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 de altos pesos moleculares. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de remoção de fenóis em meio sintético por *Aspergillus niger* AN 400 utilizando dois tipos de co-substrato (sacarose e glicose) em reatores em batelada. Diferentes concentrações de glicose e sacarose foram utilizadas (0,5 g/L, 1 g/L e 5 g/L). Foi realizado ensaio em mesa agitadora a fim de estudar a biodegradação de fenol pelo fungo. Os reatores foram divididos em quatro lotes: reator controle, reator com fungos e co-substrato I (glicose) e um reator com fungos e co-substrato II (sacarose) e reator com fungo sem co-substrato. Durante o estudo foram realizadas análises de: demanda química de oxigênio, fenóis totais, potencial hidrogeniônico e sólidos suspensos voláteis. O estudo dos resultados mostrou que foram alcançados excelentes percentuais de remoção de fenol, indicando a boa aplicação do tratamento biológico para o tratamento de águas residuárias com fenóis. Houve significativa remoção de matéria orgânica (96%) nos reatores com fungos e glicose, na concentração de 5 g/L inicial e assim como de fenol (99%) nos reatores com fungos de 94%.

Palavras-chave: biodegradação por fungos, fenol, reatores em batelada.

1. INTRODUÇÃO

Os fenóis são compostos ácidos, tóxicos e de difícil degradação, com efeitos carcinogênicos e mutagênicos cuja presença pode resultar em enormes danos ao meio ambiente e ao homem. O fenol é facilmente encontrado nas águas residuárias de indústrias de beneficiamento da castanha de caju, das refinarias petroquímicas, de indústrias têxteis, de papel e celulose, de azeite de oliva, fundição de metais, coquearias, entre outras.

Sendo um dos contaminantes oxigenados presentes em efluentes industriais, o fenol é uma substância incolor e cristalina usada como desinfetante e na produção de várias resinas poliméricas, como por exemplo, a baquelite. Por ser muito solúvel em água, constitui-se em um sério contaminante para o meio ambiente BRITTO e RANGEL (2008).

Segundo o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) (2005) a concentração de fenol permitida para ser lançada em qualquer tipo de efluentes é de 0,5 mg/L. No Brasil o Ministério Público da Saúde advertiu que em águas de abastecimento a concentração de fenol permitida é de 0,1 µg/L, a fim de evitar danos à saúde humana.

Os fungos utilizados em reatores biológicos surgem como uma alternativa interessante para o tratamento de efluentes industriais, pois são importantes decompositores na natureza, despertando interesse devido ao grande potencial desses microrganismos em degradar os mais diferentes tipos de substratos devido à secretação de diferentes enzimas, as quais atuam sobre o organopoluente, tornando-o mais acessíveis à biodegradação (RODRIGUES et al., 2006). Além disso, a rápida reprodução e proliferação desses microrganismos e a capacidade de suportarem possíveis variações de carga orgânica, oxigênio, umidade e pH, podem ser mencionados como indicadores da viabilidade em empregá-los em reatores biológicos para o tratamento de águas residuárias (RODRIGUES et al., 2006).

O objetivo de trabalho foi avaliar a remoção de fenol de meio sintético com diferentes concentrações de co-substratos (glicose e sacarose).

2. METODOLOGIA

2.1. Preparo do inoculo

Os esporos de *Aspergillus niger* AN 400 foram cultivados em placas de Petri em meio de cultura Saboraud previamente esterilizado onde foram acrescidos cloranfenicol (0,05g/L) e Vishniac (1mL/L). Depois de distribuído nas placas, a suspensão de esporos foi inoculada, permanecendo as mesmas sob temperatura de 28°C, durante período de 10 dias, até se obter o preenchimento de toda a superfície das placas. Após esse período, os esporos foram removidos com solução Tween 80% e guardados em frasco estéril para posterior contagem em câmara de Neubauer (Figura 1), utilizando microscópio ótico, com aumento de 400 vezes.

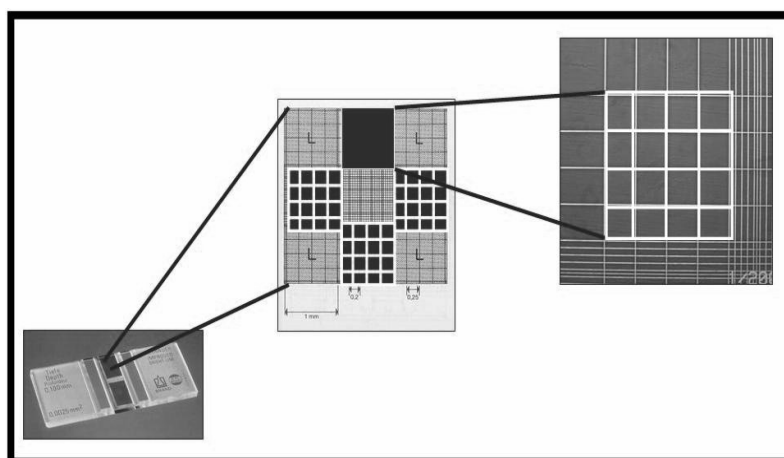


Figura 1 – Câmara de Neubauer para contagem dos esporos fungicos

2.2. Composição da água residuária sintética

A água residuária sintética utilizada no experimento teve sua composição descrita por Rodrigues (2006), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Composição da água residuária sintética

| Constituinte Químico | Concentração (mg/L) |
|----------------------|---------------------|
| $C_6H_{11}OH$ | 230 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2000 |
| $NaNO_3$ | 1000 |
| KH_2PO_4 | 200 |
| $MgSO_4$ | 250 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 10 |
| $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ | 80 |
| H_2MoO_4 | 50 |
| $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 50 |
| $Fe_2(SO_4)_3$ | 50 |
| $ZnSO_4$ | 40 |

2.3. Ensaio em batelada

Neste ensaio foram utilizados 28 frascos erlenmeyers (reatores), cada um com volume reacional de 150 mL, os quais receberam água residuária sintética, acrescida de fenol, na concentração de 250 mg/L. A classificação dos reatores está apresentada na Tabela 2. O experimento foi operado em duplicata e a determinação de dados foi feita através da média dos valores obtidos. Os frascos erlenmeyers foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 8 dias.

Tabela 2: Classificação dos reatores

| Co-substrato | RC | RFG | RFS | RF |
|--------------------|------|-------|-------|----|
| Glicose (0,5 g/L) | RC 1 | RFG 1 | - | - |
| Glicose (1,0 g/L) | RC 2 | RFG 2 | - | - |
| Glicose (5,0 g/L) | RC 3 | RFG 3 | - | - |
| Sacarose (0,5 g/L) | RC 4 | - | RFS 1 | - |
| Sacarose (1,0 g/L) | RC 5 | - | RFS 2 | - |
| Sacarose (5,0 g/L) | RC 6 | - | RFS 3 | - |
| Ausente | - | - | - | RF |

RC (Reator controle); RFG (Reator com fungo e glicose); RFS (Reator com fungo e sacarose); RF (Reator com fungos).

A glicose e a sacarose foram usadas como fontes primárias de carbono, por serem co-substratos de fácil assimilação pelos fungos (GRIFFIN, 1994). A concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 2×10^6 esporos/mL. O procedimento de inoculação dos reatores foi realizado na proximidade da chama do bico de Bunsen, a fim de minimizar contaminação.

O ensaio abrangeu período de 8 dias, ocorrendo a cada dia a retirada de uma alíquota de cada reator (RC, RF e RFG) para determinação dos parâmetros de demanda química de oxigênio e pH, que foram realizados segundo descrito em APHA (1998), e fenóis totais que foi feita segundo o método fotométrico por meio da 1-fenil,2,3-dimetil,4-amino,5-pirazolona, descrito em MERCK (1975). A determinação de fenóis ocorreu apenas no início e no final do experimento.

3. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS.

3.1. Caracterização do efluente sintético

O efluente sintético preparado apresentou as seguintes características que são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização da água residuária sintética

| Parâmetro | RC | RF | RFG | RFS |
|----------------------|------|------|------|------|
| DQO (mg/L) | 1212 | 735 | 1209 | 1327 |
| | 1315 | | 1229 | 1449 |
| | 2171 | | 2270 | 5065 |
| Fenóis Totais (mg/L) | 230 | 230 | 230 | 230 |
| pH | 3,65 | 3,71 | 3,71 | 3,71 |

3.2. Operação em batelada

Foram obtidas remoções de fenóis iguais a 100%, 93%, 37%, 100%, 88% e 15% para os reatores RC1, RC 2, RC 3, RC 4, RC 5 e RC 6 respectivamente, indicando que possivelmente tenha ocorrido contaminação do meio uma vez que observou-se o decaimento na concentração de fenóis para estes reatores. Andrade *et al* (2007) utilizando reatores em regime de batelada para tratar efluentes da indústria de beneficiamento de caju, obteve em seus reatores controle remoção de 100%, o que poderia indicar uma possível contaminação, entretanto, a água residuária utilizada pelos autores era um meio *in natura*, possuindo uma microbiota própria, diferentemente deste trabalho que se trata de um meio sintético.

Nos reatores com fungos obtiveram-se percentuais de remoção de 96%, 93%, 85%, 93%, 81%, 90% e 94% respectivos aos reatores RFG1, RFG2, RFG3, RFS1, RFS2, RFS3 e RF. De acordo com Rodrigues (2007) a presença de um co-substrato auxilia o microorganismo em seu metabolismo, uma vez que serve como fonte primária de carbono, entretanto a presença do co-substrato (glicose e sacarose) não exibiu ação na remoção do poluente, pois a remoção alcançada nos reatores com fungos RF, mostrou-se tão boa quanto à obtida nos reatores RFG1 e RFS1.

Santos *et al* (2008) trabalhando com células livres e com células imobilizadas em alginato, da levedura *Aureobasidium pollulans*, para remoção de fenol em um meio mínimo, realizaram um experimento em batelada, obtendo para as células livres uma remoção de 87% em 3 dias de operação, e com as células imobilizadas obtiveram 100% de remoção também em três dias de operação. Esses autores investigaram também a ação de co-substratos na remoção de fenol e concluíram que a glicose inibiu a biodegradação do poluente, mas não impediu que o microorganismo crescesse. Em contraposição a esta pesquisa, onde o microorganismo foi capaz de remover o composto e crescer simultaneamente utilizando as duas fontes de carbono nas suas diferentes concentrações.

Sampaio *et al* (2005) ao estudarem o efeito da glicose na remoção de metil paration presente em meio sintético usando inóculo de *Aspergillus niger*, obtiveram 82 % de remoção do composto nos reatores que continham glicose, evidenciando que a fonte primária de carbono adicionada nos reatores contribuiu satisfatoriamente para o decaimento do poluente. Realizando um paralelo com esta pesquisa, como já mencionado, a fonte de carbono não exerceu influência na remoção de fenol, mesmo em uma menor concentração (0,5 g de co-substrato/L) ou mesmo em uma maior concentração (5 g de co-substrato/L), diferentemente de Lob e Tar (2000), que ao estudarem o auxílio na fonte de carbono na remoção de fenol em meio sintético utilizando uma cultura aclimatada, verificaram que concentrações acima de 1 g de glicose/L, causaram inibição na taxa de consumo do fenol.

Ao estudar os dados referentes à matéria orgânica, pode-se perceber que os reatores RFG3, RFS2 e RFS3 mantiveram uma elevada taxa de remoção de matéria orgânica e auxiliaram bastante no crescimento de biomassa que pode ser facilmente visualizada. Os reatores RF, RFG1, RFG2, RFG3, RFS1, RFS2, RFS3 apresentaram percentuais de remoção respectivos a 94%, 83%, 45%, 98%, 83%, 97% e 49% no último dia de operação destes. A figura 4 ilustra a remoção de matéria orgânica nos reatores com fungos.

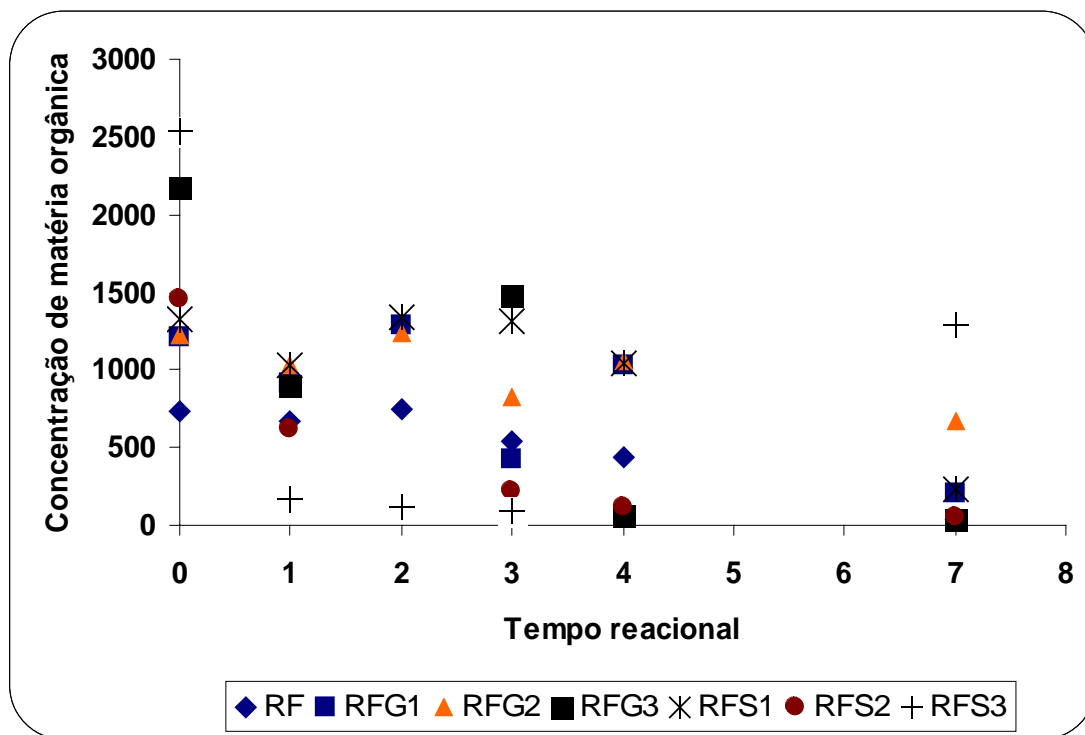


Figura 4: Remoção de matéria orgânica nos reatores com fungos

Ainda em relação à matéria orgânica, nos reatores controles foram obtidos percentuais máximos de 78%, 41%, 46%, 83%, 29% e 9% respectivamente para os reatores RC1, RC2, RC3, RC4, RC5 e RC6, no ultimo dia de operação destes reatores. A figura 5 ilustra a variação de matéria orgânica nos reatores controles.

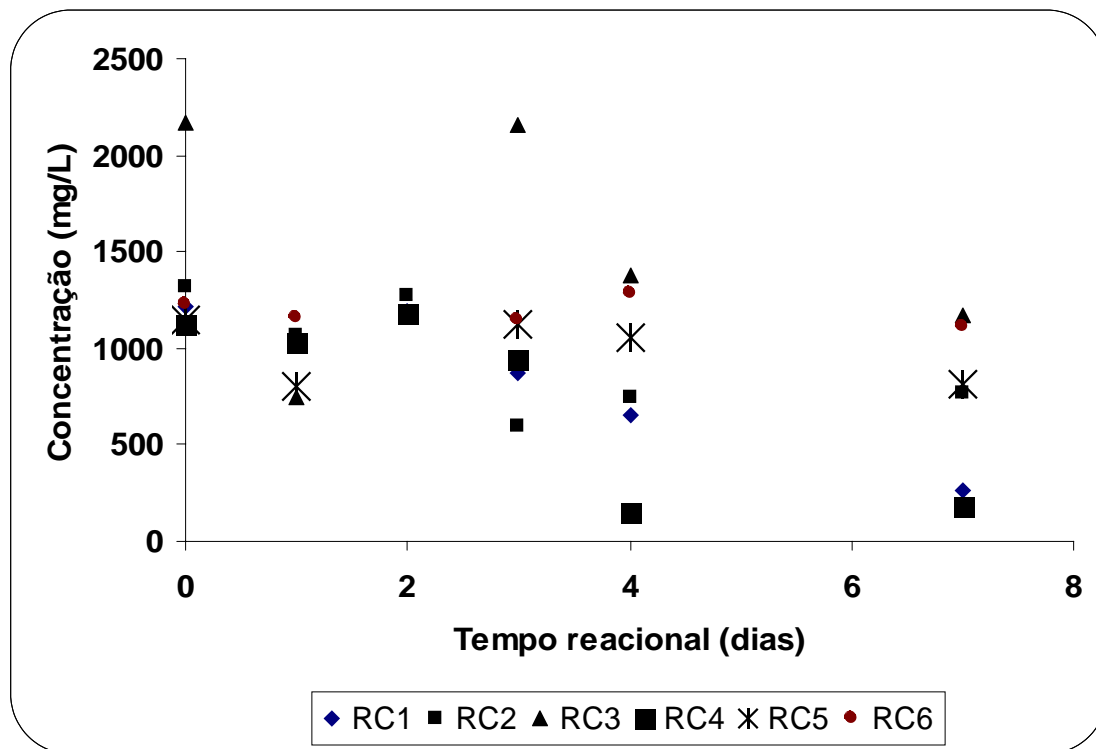


Figura 5: Variação da concentração de matéria orgânica nos reatores controles

A variação da concentração de matéria orgânica nos reatores com fungos, possivelmente ocorreu devido ao crescimento de biomassa no meio por causa da presença de uma fonte de carbono, que auxiliou no crescimento de novas células microbianas, o que incrementou na concentração de matéria orgânica bruta (não filtrada). Pinheiro *et al* (2007), estudaram a biodegradação de fenol em regime de batelada utilizando *Aspergillus niger* em reatores com fungos e em reatores com fungos e co-substrato (sacarose), e obtiveram em seus reatores com fungos e sacarose uma remoção de matéria orgânica bruta de apenas 36%, enquanto nos reatores sem sacarose obtiveram uma remoção de 86%, em contrapartida no presente trabalho foi obtido nos reatores com sacarose remoções de 83%, 97% e 96% para os reatores RFS1, RFS2 e RFS3.

Em relação aos dados de potencial hidrogeniônico, percebeu-se uma manutenção dos valores ácidos, nos reatores controles, durante todo o experimento. A figura 6 ilustra os dados de pH no meio nos reatores controles.

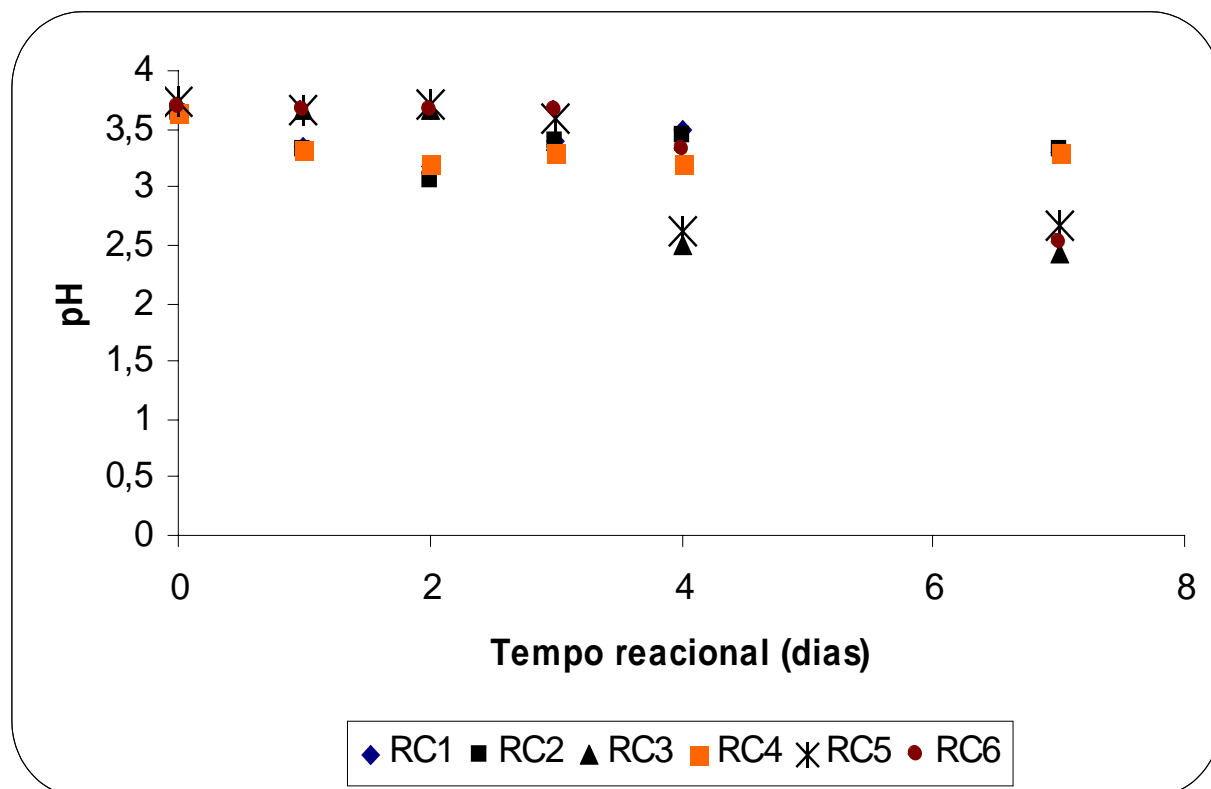


Figura 6: Variação de pH durante o experimento nos reatores controles

Nos reatores com fungos, essa mesma manutenção também foi obtida, mostrando o reflexo da atividade de biodegradação do fenol, já que, quando metaboliza este composto os fungos em geral liberam ácidos orgânicos provenientes da sua degradação como comprovado por van Schie e Young, (2000) ao estudarem a rota de biodecomposição do referido composto.

Ao estudar a figura 7, percebe-se que nos reatores que possuíam a sacarose como co-substrato, RFG2 e RFG3, os valores de pH decresceram chegando a torno de 2,1 possivelmente como sendo um melhor reflexo da atividade metabólica do microorganismo, assim como relatado por Rodrigues (2006) que estudou a remoção de fenol em meio sintético por uso de reatores biológicos em batelada e em fluxo contínuo e em seus reatores em batelada observou no meio a manutenção de características ácidas atribuindo à liberação de ácidos orgânicos não só da degradação do fenol, mas também do consumo da fonte de carbono primária.

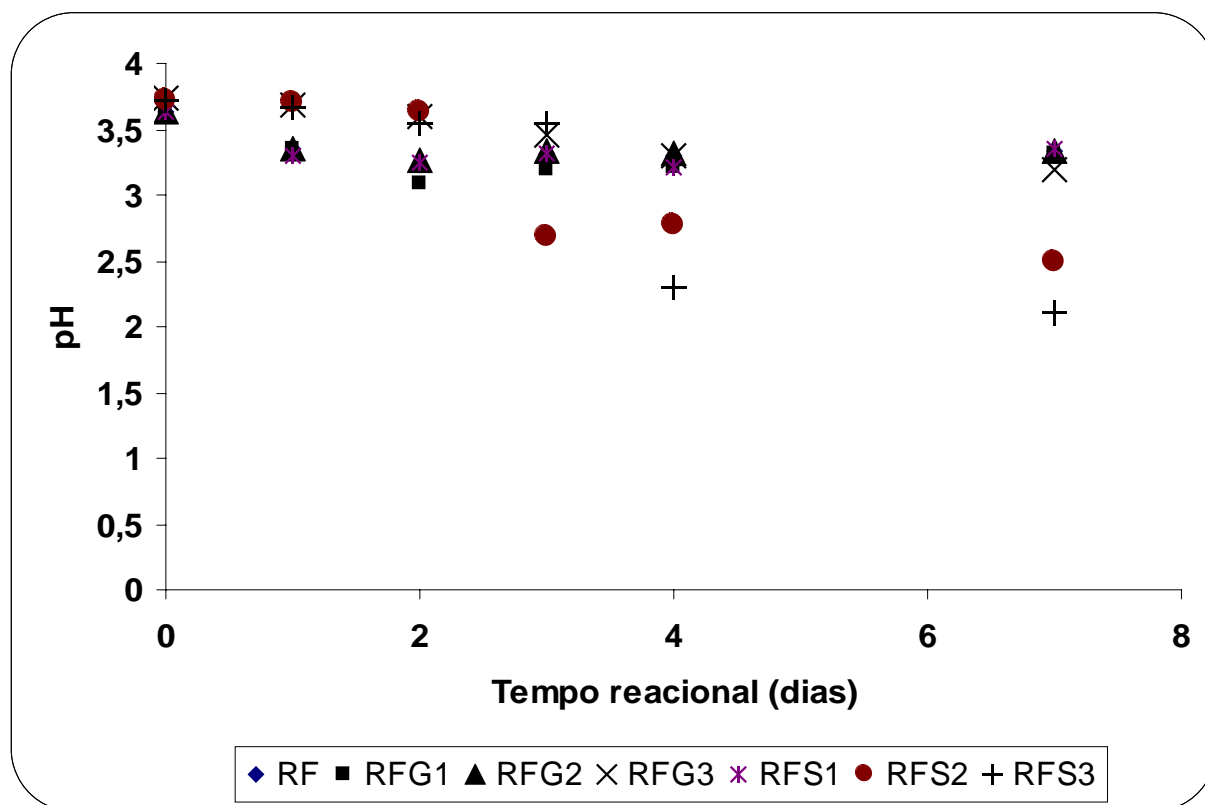


Figura 7: Variação do pH nos reatores com fungos.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitiram concluir que o ensaio em batelada utilizando a espécie *Aspergillus niger* foi eficiente na remoção de fenóis do meio, e foi capaz de crescer em todas as concentrações de fontes de carbono administradas, e não mostrou comportamento de inibição em seu crescimento nas taxas de co-substrato mais elevadas. A espécie foi capaz de remoção da concentração de matéria orgânica bruta, alcançando-se uma eficiência máxima de 98% nos reatores RFG3 e 94% nos reatores RF. Aparentemente a glicose e a sacarose não influenciaram na remoção do poluente e também na remoção da concentração de matéria orgânica. Houve uma manutenção de valores de pH com características ácidas, o que foi benéfico para o desenvolvimento do fungo.

5. BIBLIOGRAFIA

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: American Public Health Association, 1998

ANDRADE, M. V. F.; NOBRE, L. M. S.; OLIVEIRA, K. L.; SAMPAIO, G. M. M. S.; RODRIGUES, K. A. (2007). **Uso de reatores em batelada com inoculo de *Aspergillus niger* para tratamento de uma água residuária da indústria de beneficiamento do caju**. II CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2007, João Pessoa. Anais... João Pessoa: CEFET-PB. um CD-ROM.

BRITTO, J.M., RANGEL, M.C. (2008). **Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais**. Química Nova. Vol. 31 nº 1, 114 – 122.

CONAMA. Resolução nº. 274, de 29 de novembro de 2005, Conselho Nacional do Meio Ambiente, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. 2005.

DARMSTADT, E. MERCK. **The testing of water**. 9th ed. Berlin: MERCK, 1972. 166 p

GRIFFIN, D. H.; **Fungal Physiology**. Wiley-Less, New York, 344 p, 1994.

LOB, K.C., TAR, P. (2000). **Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol**. Bull, Environmental Contamination and Toxicology. 64: 756 – 763.

PINHEIRO, Z.B., DAMASCENO, E.P., SILVA, G.M.M., SAMPAIO, G. M. M. S.; RODRIGUES, K. A. (2007). **Degradação de fenol por *Aspergillus niger* an400 em reatores em batelada**. II CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2007, João Pessoa. Anais... João Pessoa: CEFET-PB. 1 CD-ROM

SAMPAIO, G.M.M.S., RODRIGUES, KA, LEITÃO, R.C., ZAIAT, M., SANTAELLA, S.T. (2005). **Efeito da glicose na remoção de metil paration presente em água por *Aspergillus niger* AN400**. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.

SANTOS, V.L., MONTEIRO, A.S., BRAGA, D.T., SANTORO, M.M. (2008). **Phenol degradation by *Aureobasidium pollulans* FE13 isolated from industrial effluents**. Journal of Hazardous Materials. 10; 1016: 1025 – 10.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reator biológico com fungos para remoção de fenol de uma água residuária**. 2006. 144p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RODRIGUES, K.A., SAMPAIO, G.M.M.S., ZAIAT, M., SANTAELLA, S.T. (2007). **Influência da glicose sobre o consumo de fenol por *aspergillus niger* an 400 em reatores em batelada**. Eng.Sanit. Ambiental, v. 12 no. 2-abr/jun, 222 – 228.

van SCHIE, P. M., YOUNG, L. Y. (2000). **Biodegradation of phenol: mechanisms and applications**. Bioremediation Journal. 4; 1: 1 – 18.