

# USO DE *Aspergillus niger* AN400 COMO INÓCULO DE REATOR DE ESCOAMENTO CONTÍNUO PARA REMOÇÃO DE ATRAZINA.

**Marcela LAVÔR (1); Lorena LIMA (2); Sara FIRMINO (3); Rinaldo ARAÚJO (4); Kelly RODRIGUES (5); Glória MARINHO (6)**

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, e-mail: [marcela.lavor@hotmail.com](mailto:marcela.lavor@hotmail.com) , (2) Universidade Federal do Ceará - UFC, e-mail: [loryquimica@yahoo.com.br](mailto:loryquimica@yahoo.com.br) , (3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE e-mail: [sarinha\\_firmino@hotmail.com](mailto:sarinha_firmino@hotmail.com) , (4) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, e-mail: [rinaldo@ifce.edu.br](mailto:rinaldo@ifce.edu.br); (5) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, e-mail: [kelly@ifce.edu.br](mailto:kelly@ifce.edu.br) , (6) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, e-mail: [gloriamarinho@ifce.edu.br](mailto:gloriamarinho@ifce.edu.br).

## RESUMO

O uso abusivo de pesticidas na agricultura a cada ano vem causando prejuízos incalculáveis ao meio ambiente. A atrazina é um pesticida utilizado no controle de ervas daninhas, apresentando como vantagens seu uso em sinergia com outros herbicidas, além do custo baixo. Porém apresenta grande potencial de contaminação de águas subterrâneas. Este estudo objetivou verificar a viabilidade da utilização do fungo *Aspergillus niger* AN400 como inóculo de reator de escoamento contínuo e leito fixo na degradação de atrazina de água acrescida de glicose e solução de nutrientes. O experimento foi conduzido em etapas: produção e contagem de esporos, montagem e operação do reator, sendo utilizado tempo de detenção hidráulica (TDH) de 6 horas. As variáveis analisadas foram: potencial hidrogeniônico (pH), concentração de demanda química de oxigênio (DQO), atrazina, nitrato, nitrito e amônia. Verificou-se remoção máxima de atrazina de 44%, no 8º ponto de amostragem, demonstrando a potencialidade do uso de reator de bancada com fungo no tratamento de águas contaminadas com atrazina.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger* AN400; atrazina; glicose; reator contínuo.

## 1- INTRODUÇÃO

A atrazina é um herbicida seletivo da classe dos triazínicos, classificado como de uso restrito, devido ao seu grande potencial de contaminação de águas subterrâneas possui sendo de baixo custo e pode ter características como: alto potencial de escoamento, persistência no solo, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade em água baixa a moderada, absorção moderada pela matéria orgânica e pela argila (UETA *et al.*, 2002). A atrazina possui toxicidade aguda de leve a moderada para humanos e alguns animais. As vias de absorção são oral, dérmica, ou por inalação, entre outros sintomas estão dores abdominais, diarreias e vômitos e irritação dos olhos e mucosas. A biodegradação é considerada o processo mais importante de remoção de atrazina no meio ambiente e são muitos os microorganismos isolados de ecossistemas aquáticos e do solo capazes de degradar atrazina (EPA, 2003).

A potencialidade de se empregar fungos para o tratamento de substâncias persistentes está relacionada à produção de grande número de enzimas extracelulares cujas ações tornam os organopoluentes mais acessíveis à biodegradação. Além disso, a capacidade dos fungos de suportar mudanças bruscas na contaminação de matéria orgânica, tolerar grandes variações de pH e de temperatura e se adequar a variações e escassez de umidade e de oxigênio são indicadores da viabilidade do processo de tratamento com reatores fúngicos (SAMPAIO, 2005; RODRIGUES, 2006).

A espécie estudada neste experimento foi *Aspergillus niger* AN400 que possui eficiência comprovada para degradação de compostos recalcitrantes tais como atrazina, metil paration e muitos outros agrotóxicos da família dos organofosforados (GARCIA et al., 2003; FELIX et al., 2006). Assim, a referida espécie foi utilizada como inóculo de reator aeróbio de leito fixo, operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 6 horas, para degradação de 15 mg/L de atrazina, utilizando glicose como cossustrato, na concentração de 1 g/L.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Cultivo, produção e contagem dos esporos de *Aspergillus niger* AN400**

Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram produzidos em placas de Petri estéreis contendo 15 mL de meio de cultura Saboraud Dextrose, previamente esterilizado a 121° C, durante 15 minutos, e 1 mL de solução de Vishniac, como fonte de nutrientes para os fungos. As placas permaneceram a 28° C, durante cinco dias, para o crescimento dos esporos por toda sua superfície, período após o qual os mesmos foram removidos para tubos de ensaio para posterior contagem. A remoção dos esporos das placas de Petri foi realizada com uso de alça de Drigalsky e solução de Tween 80.

Para a contagem dos esporos foi preparada uma solução de esporos utilizando 50 µL de suspensão, previamente agitada em agitador tipo Vórtex, acrescido de 950 µL de solução Tween 80, resultando em diluição de 1:20. Em seguida, 20 µL da solução preparada foram trans-feridos para câmara de Neubauer, onde se procedeu a contagem dos esporos em microscópio óptico Bioval com aumento de 400 vezes.

### **2.2 Água residuária**

A água residuária foi preparada com água de torneira, acrescida de 1ml/L de Vischiniac (solução de nutrientes), 1mg/L de glicose e atrazina na concentração de 15 mg/L. O pH do afluente foi ajustado artificialmente, com ácido sulfúrico 10%.

### **2.3 Imobilização da biomassa**

O meio suporte empregado foi constituído por manta de poliuretano, esterilizada em autoclave durante 20 minutos a uma temperatura de 121°C, cortada em quadrados de 2x2 cm e adicionada ao reator. Foi acrescida uma solução de nutrientes para desenvolvimento e conseqüente crescimento do fungo. A imobilização de microrganismos em meios suportes é uma técnica que tem por objetivo limitar a migração de células livres, podendo ocorrer por uma adesão artificial (induzida), ou natural (auto-imobilização).

### **2.4 Reator**

O reator era constituído de um tubo cilíndrico em acrílico com volume total de 5 L e com volume útil de 3,5 L, diâmetro interno de 90 mm, 95 cm de altura, dispositivo de entrada e saída da amostra e um dispositivo de entrada de ar, cujo fornecimento foi realizado por compressor de ar. Na montagem do suporte de entrada e saída da água residuária no reator, foram utilizados 2 recipientes cilíndricos de plásticos, com tampa e com volume total de 50 L. Para a entrada do afluente ao reator foi empregada bomba peristáltica o TDH (Tempo de Detenção Hidráulica) foi de 6 horas.



**Figura 1 – Biomassa imobilizada**

## **2.5 Variáveis analisadas**

Foram analisadas as seguintes variáveis: Potencial hidrogeniônico, concentrações de amônia, nitrito, nitrato, DQO (Demanda Química de Oxigênio) e atrazina, de acordo com APHA (2005), exceto atrazina cuja determinação foi realizada por cromatógrafo líquido Varian Pro Star (modelo 210, equipado com detector UV-VIS), sistema com fase móvel metanol/água (70:30 v/v),  $\lambda = 221$  nm,  $Q = 1,0$  mL/min e volume de injeção de 50  $\mu$ L.

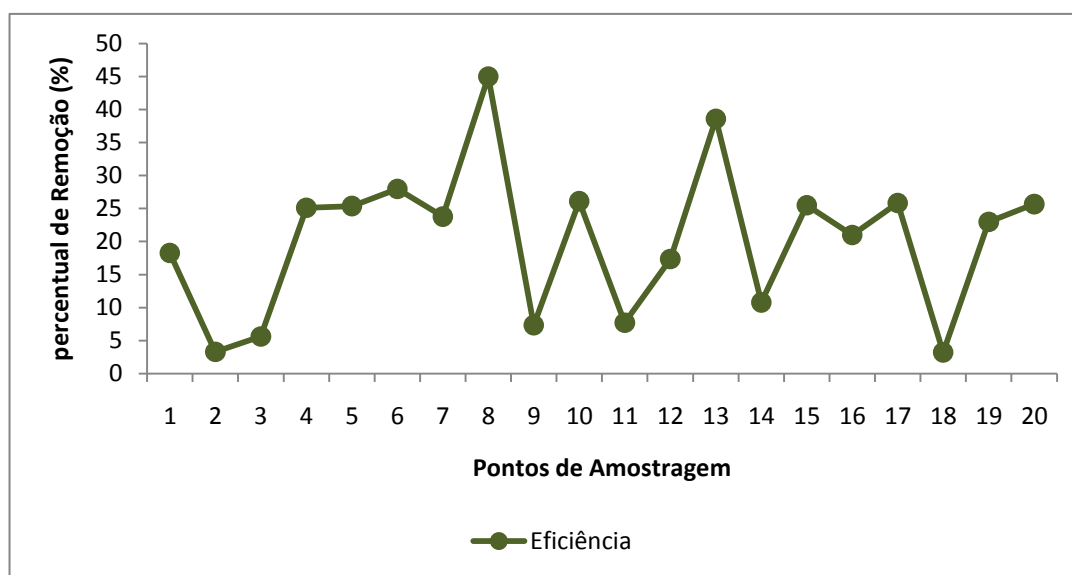
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.1 Atrazina**

SAMPAIO (2005) alcançou eficiência média de remoção do pesticida metil paration de 40%, utilizando reator de escoamento contínuo e leito fixo, inoculado com *Aspergillus Níger*, operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 horas, utilizando a concentração de 0,5 g/L de glicose. A autora em uma outra fase do seu experimento objetivou verificar a influência da concentração de glicose sobre a melhora de eficiência de remoção de metil paration, tendo estudado duas concentrações de glicose, de 0,5 g/L e 1 g/L. Houve diminuição da remoção do pesticida, na concentração de 1,0 g/L de glicose para 35%, mostrando que o aumento da concentração do cossubstrato não foi diretamente proporcional a eficiência de remoção de metil paration. Nesta pesquisa, onde o TDH foi de 6 horas e a quantidade de glicose foi de 1,0 g/L de glicose, houve uma significativa remoção de atrazina, como é mostrado na Figura 2.

De acordo com Kyriacou et al. (2005), a atividade microbiana pode ser diretamente relacionada com a quantidade de biomassa. A concentração de microrganismos dentro do reator é um fator importante no tratamento da água residuária, sendo que, respeitando aspectos relacionados à limitação de difusão de substrato, quanto maior a população microbiana, maior será a eficiência de remoção do poluente para uma dada concentração, pois à medida que a população aumenta, há menor disponibilidade de alimento para os microrganismos e, conseqüentemente, melhor polimento da água residuária. Nesta presente pesquisa foi observado o crescimento da biomassa que, a cada dia, era visível e acentuado, chegando muitas vezes a colmatação do reator.

Sampaio (2005), onde na fase experimental com atrazina e esporos de *Aspergillus niger* AN400, a presença do substrato primário (glicose) não teve influência na remoção de atrazina, onde os percentuais de remoção foram muito próximos aos percentuais encontrados nos reatores sem glicose.



**Figura 2 - Eficiência de remoção de Atrazina no reator de leito fixo, com inoculo fúngico, operado com TDH de 6 horas, com adição de 1g/L de glicose.**

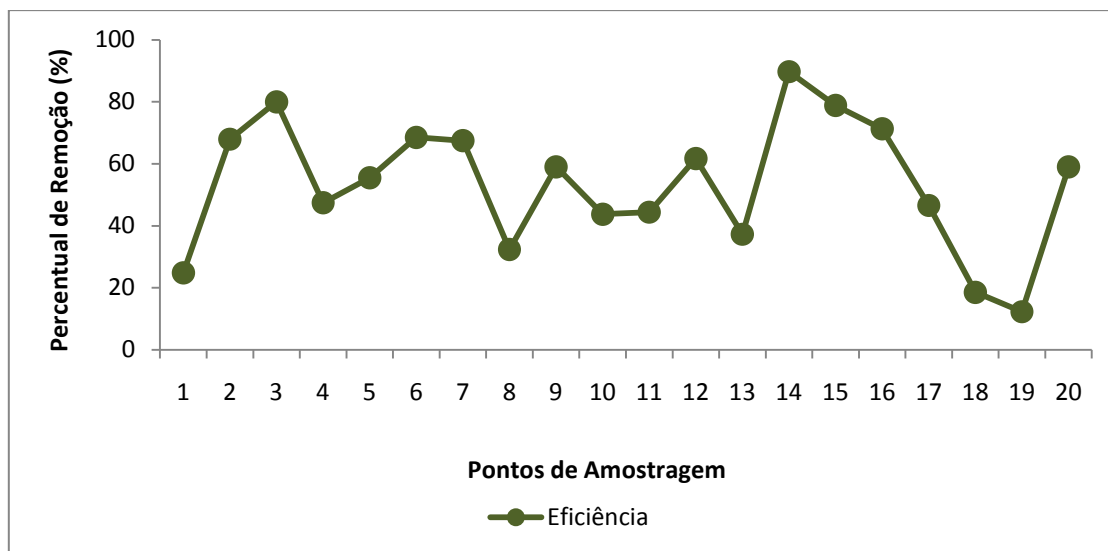
Por outro lado, Ghosh e Philip (2004) que estudaram quatro reatores em batelada para avaliar o potencial de degradação da atrazina em cultura mista de micro-organismos anaeróbios sob um sistema de alimentação em condições diferentes, com a presença de um co-metabólico (glicose na concentração de 150 mg/L) resultando em melhor mineralização do herbicida do que no reator que empregou atrazina como única fonte de carbono e nitrogênio, tendo como resultados, um significativo valor de 43 à 45% de remoção do pesticida com um TDH de 5 dias. No entanto quando a matéria orgânica dissolvida na água residuária foi superior a 2000 mg/L, foi observado apenas de 8 à 15% de remoção da atrazina.

No presente experimento, a maior remoção de atrazina foi de 44% , no 8º ponto, registrando-se média de remoção de 20%, porém em um TDH muito menor, de 6 horas, podendo-se caracterizar melhor eficiência nos resultados de remoção do pesticida do reator com fungos.

### 3.2 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Na Figura 3 são apresentadas variações da eficiência de remoção. O maior percentual de remoção foi de 89%, no 14º ponto de amostragem, e de 12%, no 19º ponto, caracterizando a menor remoção. Já a remoção média nesse período foi de 53%.

Segundo Rodrigues (2006), a glicose, por ser um composto mais facilmente degradado, acelera o metabolismo do microrganismo resultando em um aumento mais rápido da biomassa, e, conseqüentemente, melhora a eficiência de remoção de matéria orgânica, devido ao seu maior consumo pela população microbiana. Neste experimento também foi utilizado glicose como cossustrato, observando grande crescimento de biomassa.



**Figura 3 – Eficiência de remoção de DQO no reator de leito fixo, com inoculo fúngico, operado com TDH de 6 horas, com adição de 1g/L de glicose.**

No final do experimento, houve diminuição na eficiência de remoção da matéria orgânica. A diminuição desse percentual pode estar associada à excreção de metabólitos, pois durante a síntese de produção de biomassa, ocorre a utilização da fonte de carbono pelos fungos produzindo energia e metabólitos que podem ser acumulados no interior da célula ou excretados (WITTEVENN, 1993).

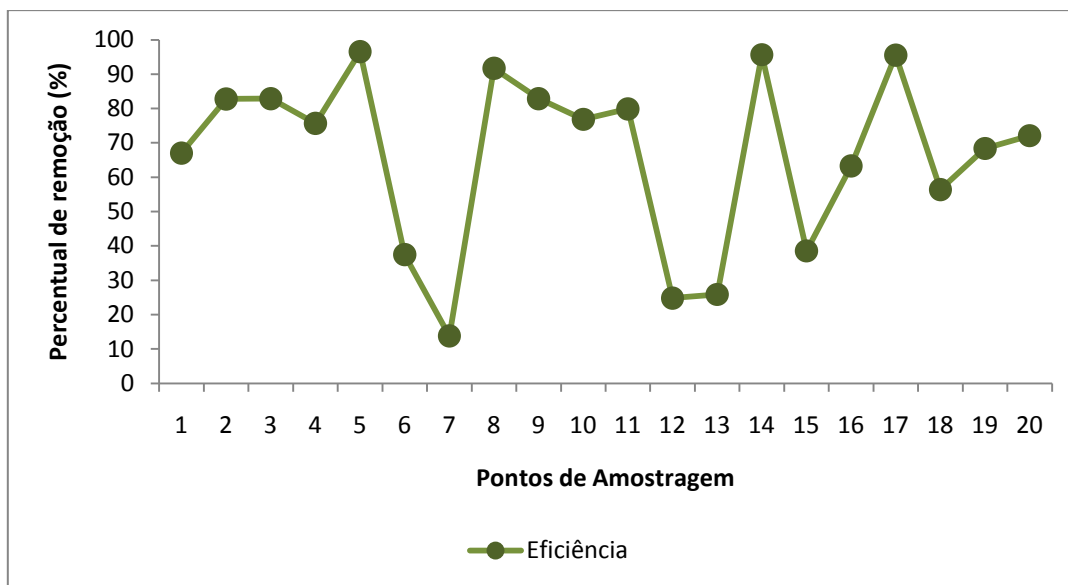
### 3.3 Amônia e Nitrato

Os percentuais de remoção de amônia durante o período observado foram em maioria superiores a 50%, chegando a 96%, no 5º ponto de amostragem do experimento caracterizando a maior remoção, já o 7º ponto com 13% caracterizou a menor remoção (Figura 4) a média de remoção do nitrogênio amoniacal foi de 66%.

Martins *et al.* (2008) estudaram a degradação de 15 mg/L atrazina em reatores em batelada. Os autores utilizaram reatores em duplicata composto por: 2 de controle (C), contendo apenas o efluente sintético; 2 com efluente sintético e fungos (RF) e 2 com efluente sintético, fungos e 0,5g/L de glicose (RFG). Foi observada síntese de amônia no reator inoculado com fungo (RF), o que foi explicado pelo fato de não haver glicose disponível no meio, uma vez que o fungo a partir do consumo da glicose produz mais facilmente  $\alpha$ -acetogluturato, intermediário do ciclo tricarboxílico, que reage com  $\text{NH}_4^+$  para sintetizar aminoácidos importantes (GRIFFIN, 1994). Já no reator que apresentava o cossubstrato não houve uma remoção significativa, apresentando concentrações similares.

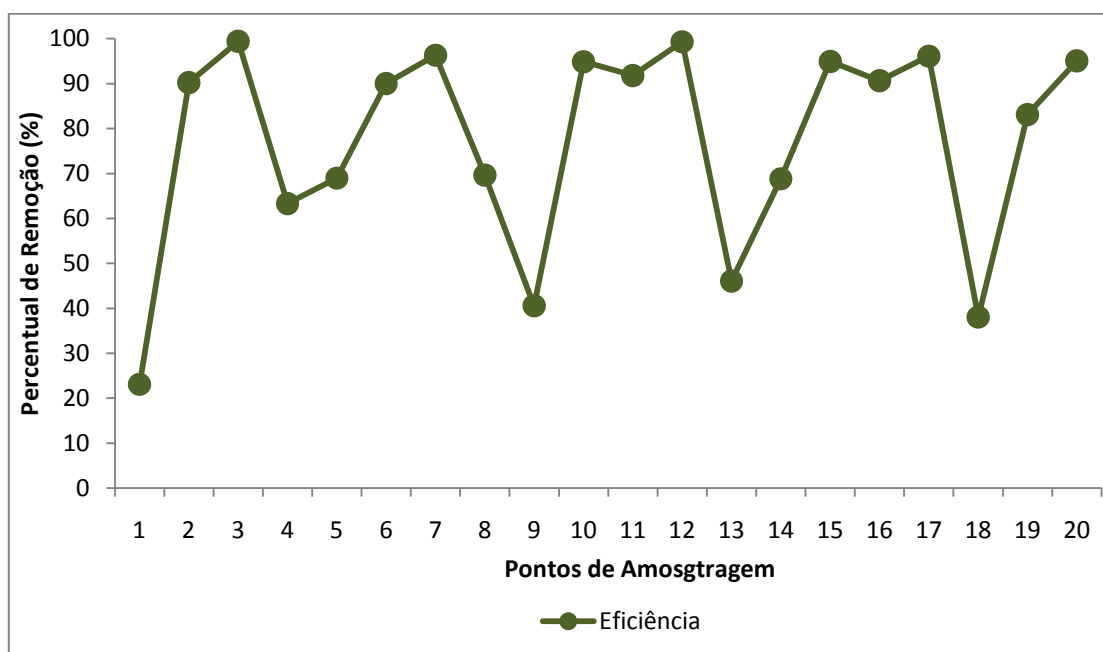
No presente trabalho não houve em nenhum momento liberação ou síntese de amônia e nem nitrato. As concentrações afluentes de nitrogênio foram baixas e assim o fungo empregou atrazina como única fonte deste nutriente.

Os percentuais de remoção do nitrato (Figura 5) foram bem significativos, onde os pontos 3 e 12 alcançaram uma eficiência de 99%, já o ponto 1 obteve a menor remoção com 23%.



**Figura 4 – Eficiência de remoção de Amônia no reator de leito fixo, com inoculo fúngico, operado com TDH de 6 horas, com adição de 1g/L de glicose.**

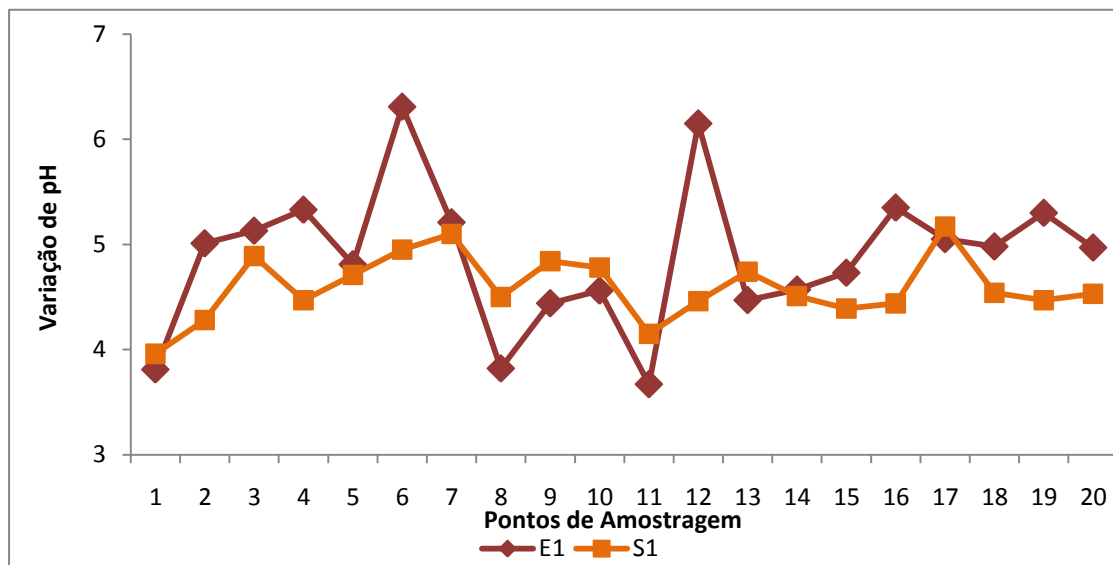
Pereira (2003) observou em sua pesquisa que fungos filamentosos podem metabolizar uma série de compostos nitrogenados para obterem o requerimento nutricional necessário para o seu desenvolvimento e que esses organismos possuem proteínas reguladoras que asseguram grande eficiência na utilização nas fontes de nitrogênio disponíveis. A partir de vários processos catalisados por enzimas ocorre a redução sequencial do nitrato a nitrito e do nitrito a amônia, que é considerado o ponto de partida para o metabolismo do nitrogênio em fungos ocorrendo assim a incorporação em moléculas orgânicas.



**Figura 5 - Eficiência de remoção de Nitrato no reator de leito fixo, com inoculo fúngico, operado com TDH de 6 horas, com adição de 1g/L de glicose.**

### 3.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Os valores do efluente variaram entre 3,6 e 6,3 como mostrado na Figura 6. A diminuição do pH do efluente, pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos pelos fungos.(ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).



**Figura 6 - Variação de pH no reator de leito fixo, com inoculo fúngico, operado com TDH de 6 horas, com adição de 1g/L de glicose.**

A faixa ácida é melhor para melhor desenvolvimento do fungo, pois segundo SPIER (2005) a faixa de pH entre 3 e 5 é onde ocorre a maior produção de enzimas fúngicas, destacando a faixa entre 4 e 5 para a espécie *Aspergillus niger* como a de maior estabilidade da enzima e embora a faixa ideal de pH para o crescimento dos fungos, de modo geral, seja de 4,0 a 7,0, eles são capazes de sobreviver e crescer em meio com uma faixa mais ampla de pH, de 2,0 a 9,0 (GRIFFIN, 2003).

## 4. CONCLUSÕES

A comunidade microbiológica formada na fase do experimento, em reator contínuo utilizando micélio fúngico, com predomínio da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400, mostrou-se viável ao tratamento biológico com fungos para remoção de atrazina;

A presença do substrato primário (glicose) foi importante no início do crescimento dos fungos, para a adaptação dos microrganismos à água residuária com atrazina;

O experimento demonstrou a potencialidade do uso de reator com fungos no tratamento de águas contaminadas com atrazina, porém ha necessidade de novos estudos visando a otimização do sistema.

## 5. AGRADECIMENTOS

A Deus.

A FUNCAP pela concessão de bolsa de iniciação científica;

As professoras Kelly Rodrigues e Glória Marinho pela orientação e oportunidade de desenvolver o projeto no LATAM (Laboratório de Tecnologia Ambiental), do IFCE.

## 6. REFERÊNCIAS

- APHA, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18 ed Washington: American Public Health Association, (2005).
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, **Ambient aquatic life water quality criteria for atrazine** – revised draft, (2003).
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul. Rio Grande do Sul. 2004.
- ESTÉVEZ, E; VEIGA, M.C; KENNES, C. **Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma***. 2005
- 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).
- GARCIA, G. et al.. **Removal of phenol compounds from olive Mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum***. Process Biochemistry, (2003).
- GHOSH, P. K.; PHILIP, L. **Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium**. Water Research, v. 38, pp. 2277-2284, 2004.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal Biodegradation**. 2. ed. New York, (1994).
- KYRIACOU, A. et al. **Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater**. Process Biochemistry, n. 40, p. 1404 – 1408, 2005
- MARTINS, **Biodegradação de Atrazina em Reatores em Batelada Aerada inoculados com *Aspergillus niger* AN 400**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, (2008).
- PEREIRA, J. F. **Nitrato Redutase em Fungos Filamentosos**, 2003.
- 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
- SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores com fungos**, São Carlos, 2005. Tese de doutorado-Escola de engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. 2005.
- SPIER, M. R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas  $\alpha$ -Amilase e Amiloglucosidade por Fermentação no Estado Sólido**, (2005).
- UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. **Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina**. Biotecnologia, Brasília, v. 10, p. 10-13, 2000.
- WITTEVEEN, **Gluconato formation and polyol metabolism in *Aspergillus niger***. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 1993.