

EMPREGO DE ETANOL COMO COSSUBSTRATO EM REATOR COM BIOMASSA IMOBILIZADA DE *Aspergillus niger* AN 400 PARA REMOÇÃO DE VERMELHO DO CONGO.

Manuela de MIRANDA (1); Camila GABRIELE (2); Karla Mayara Lima da SILVA (3); Carlos Ronald Pessoa WANDERLEY (4); Glória MARINHO (5); Kelly RODRIGUES (6)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Av. Treze de Maio, 2081, Benfica – Fortaleza, CE, e-mail: manuelahfranco@yahoo.com.br

(2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Av. Treze de Maio, 2081, Benfica – Fortaleza, CE, e-mail: camilasmg@gmail.com

(3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Av. Treze de Maio, 2081, Benfica – Fortaleza, CE, e-mail: karlamayara.ifce@gmail.com

(4) Depto. de Química e Meio Ambiente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Maracanaú, e-mail: ronald@ifce.edu.br

(5) Depto. de Química e Meio Ambiente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Fortaleza, e-mail: gloriamarinho@ifce.edu.br

(6) Depto. de Química e Meio Ambiente, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Fortaleza, e-mail: kelly@ifce.edu.br

RESUMO

O descarte de efluentes realizado de forma inadequada em corpos hídricos tem contribuído para uma grande degradação ambiental. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo a remoção do corante Vermelho do Congo de efluente sintético têxtil, utilizando tratamento biológico com *Aspergillus niger* AN 400, inoculado em reator em batelada seqüencial. O etanol (0,5 g/L) foi adicionado como cossustrato no meio basal para verificar sua influência durante o processo de tratamento. O estudo foi realizado em escala laboratorial, operado em 24 ciclos de 48 h de duração. Durante o experimento foram analisadas as variáveis: teor de corante, matéria orgânica (medida em DQO bruta e dissolvida), amônia, nitrato, nitrito, ortofosfato, fósforo, além do monitoramento de pH e oxigênio dissolvido. Os resultados obtidos em termos de remoção média foram 74% de matéria orgânica bruta, 77% de matéria orgânica dissolvida, 93% de corante. Sendo assim, o emprego de etanol como cossustrato mostrou-se viável para remoção de corante e matéria orgânica.

Palavras-chave: *Aspergillus niger* AN 400, batelada seqüencial, etanol, Vermelho do Congo.

1 INTRODUÇÃO

A indústria têxtil representa um importante setor da economia brasileira, apresentando considerável crescimento nos últimos anos. Como consequência deste, tem aumentado também a produção de efluentes, representando um potencial contribuinte à degradação do meio ambiente. Uma das principais características destes efluentes é que os mesmos são altamente coloridos, resultado principalmente dos corantes que são aplicados nas etapas de tingimento (dos SANTOS, 2005).

Segundo Reis (2006), a classe de corantes mais utilizada nas indústrias têxteis é a dos corantes azo, que são substratos coloridos, solúveis em água, de baixa degradabilidade, de caráter mutagênico e carcinogênico. Sendo caracterizados pela dupla ligação entre as moléculas de nitrogênio ($-N=N-$).

O lançamento de efluentes têxteis ao corpo aquático sem o devido tratamento acarreta danos ao ambiente aquático, resultando em concentrações de oxigênio dissolvido reduzida, possibilitando um ambiente anóxico, consequentemente desfavorecendo os micro-organismos aeróbios (CHANDER e ARORA, 2007). Por dificultarem a penetração da luz, os corantes existentes nesses efluentes, impossibilitam a fotossíntese e interferem nos ciclos biológicos causando sérios problemas ambientais (YESILADA, 2003).

Existem processos físicos, químicos e biológicos para tratamento desses efluentes, entretanto, dependem de fatores como os custos e a estrutura molecular do corante, sendo os processos biológicos os mais viáveis (WANDERLEY, 2007).

Dessa forma, várias tecnologias para o tratamento dos efluentes têxteis são sugeridas, incluindo o uso de bactérias, fungos ou os dois simultaneamente (CHANDER e ARORA, 2007). A remoção de cor por biomassa fúngica (viva ou morta) vem sendo tema de muitas pesquisas recentes, de modo que esta tecnologia tem sido amplamente investigada (FU, 2002),

Segundo Hansen (2009), o grande potencial de fungos na remoção de corantes têxteis pode ser explicada pelo fato destes micro-organismos identificá-los, consumindo-os naturalmente como nutrientes, desencadeando um processo de absorção, sendo o corante transformado em substâncias mais simples que são captadas por meio de seus filamentos.

Desta forma, o objetivo do trabalho em questão é estudar a remoção do corante Vermelho do Congo de água residuária sintética com a utilização de reator em batelada sequencial, com linhagem de *Aspergillus niger* AN400, empregando o etanol como co-substrato.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Imobilização

O processo de imobilização do *Aspergillus niger* AN400 foi baseado em Vassilev (1997). Foram utilizados cubos (1 cm x 1 cm) de espuma de poliuretano, dentro de erlenmeyers contendo 150 mL do meio de crescimento, que continham o inóculo na concentração de 2×10^6 esporos/mL, macro e micronutrientes. Esses erlenmeyers foram mantidos durante 7 dias em agitação de 150 rpm para crescimento fúngico. Após esse procedimento, os cubos, apresentando uma massa total de 9,24 g, foram agrupados em redes de polietileno e transferidos para o reator.

2.2. Composição da Água Residuária

A água residuária sintética que preenchia o reator foi preparada com água da torneira acrescida de micronutrientes, macronutrientes e do azo Corante Vermelho do Congo. Adicionou-se também etanol no meio, na concentração de 0,5 g/L, a fim de verificar a influência deste sobre o metabolismo fúngico. A concentração empregada do corante vermelho do congo foi de 30 ppm. A composição da água residuária, que foi adaptada de Rodrigues (2006), possuía a seguinte composição (g/L): $\text{Fe}_2(\text{SO}_3)_4$ (0,05), NaNO_3 (1,0), K_2HPO_4 (0,2), MgSO_4 (0,25), CaCl_2 (0,01), CuSO_4 (0,08), $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ (2,0), $\text{H}_2\text{M}_6\text{O}_4$ (0,05), ZnSO_4 (0,04).

2.3. Montagem e Operação do reator

Após a imobilização, a massa fúngica foi transferida para um reator cilíndrico de vidro com tampa rosqueável, apresentando volume total de 5 L e volume reacional de 4 L, o qual foi operado em regime de batelada sequencial. O sistema de aeração foi realizado por mini compressores de ar, sendo difundido para o meio por pedras porosas. O reator foi operado em 24 ciclos de 48 h. Sendo coletadas amostras do afluente e efluente.

Foram analisadas as seguintes variáveis: matéria orgânica em termos de DQO (dissolvida e bruta), corante, amônia, nitrito, nitrato, pH, oxigênio dissolvido (OD), fósforo e ortofosfato, realizadas de acordo com APHA (1999), com exceção de corante e nitrato, as quais seguiram o descrito por Silva Filho (2006) e Rodier (1975).

2.4 Estimativa da Massa de Corante Adsorvido

Uma amostra do material suporte, que possuía aderido à sua superfície o biofilme fúngico, foi retirada do reator e transferida para erlenmeyer, contendo 50 mL de água destilada e pérolas de vidro, procedendo-se à agitação manual vigorosa até o desprendimento da biomassa que se encontrava aderida.

Em seguida, a biomassa foi separada do conteúdo líquido por centrifugação, durante 20 minutos, em uma rotação de 3500 rpm, sendo então transferida para erlenmeyer, ao qual se adicionou 15 mL de metanol. A biomassa foi macerada durante 5 minutos e posteriormente centrifugada, nas mesmas condições

anteriormente descritas, para separação das fases, medindo-se a concentração de corante no conteúdo líquido.

Paralelamente, o material suporte, isento da biomassa, foi adicionado em erlenmeyer, juntamente com 15 mL de metanol, visando à remoção do corante adsorvido na esponja.

Os resultados foram lidos no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 500 nm.

2.5 Estimativa da Biomassa presente no reator

Ao final da operação do reator, foi retirada um cubo suporte de espuma – com biomassa aderida – colocado em um erlenmeyer com pérolas de vidro, adicionando-se 100 mL de água destilada. Procedeu-se à agitação manual até o desprendimento da biomassa.

O conteúdo do erlenmeyer foi filtrado à vácuo, com uso de membrana de fibra de vidro, com porosidade 0,47 μm , a qual foi previamente pesada. Posteriormente, a membrana contendo a biomassa retida foi levada para mufla a 550°C e, em seguida, para estufa para estabilização da temperatura em 100°C, quando foi para dessecador, onde permaneceu até obtenção do peso constante, obtendo-se a concentração de biomassa em termos de sólidos suspensos voláteis (SSV).

O cubo suporte de espuma – isento da biomassa aderida – também foi submetido à secagem em estufa a 100°C e conduzido para o dessecador até obtenção do peso constante, calculando-se a quantidade em gramas de biomassa por grama de espuma.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O pH do meio permaneceu ácido durante toda a realização do estudo, variando entre 5 e 3, respectivamente, no afluente e efluente de cada ciclo operacional, oferecendo ótimas condições de desenvolvimento fúngico (GRIFFIN, 1994). Essa redução de pH observada durante o experimento pode ser explicada pela formação de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, por exemplo, tanto pelo uso do etanol, como cossustrato no meio, quanto pelo consumo do corante pelos fungos (YAYKAŞLI *et al.*, 2005; WANDERLEY, 2007).

Em termos de matéria orgânica, a eficiência média da DQO bruta foi de 74% e a de DQO dissolvida foi de 77%. Do 1º ao 17º ciclo, a remoção de matéria orgânica não acompanhou o decaimento da concentração de corante, sendo que no 7º ciclo a menor remoção de matéria orgânica observada, em termos de DQO dissolvida (60%), e 95% de corante, pode ser explicado pela possível formação de subprodutos. Segundo Ikeda *et al.* (2006), quando a espécie *Aspergillus niger* utiliza da fonte de carbono na síntese de biomassa, produz metabólitos, que podem sofrer acumulação intracelular ou podem ser excretados.

A eficiente aeração, pH adequado e disposição de nutrientes, propiciaram ao fungo condições ótimas de crescimento, tornando o biofilme mais espesso e dificultando a passagem de nutrientes e oxigênio às camadas mais internas do biofilme, ocasionando desprendimento de biomassa (CHAVES, 2004), podendo ser observada no 7º e 8º ciclos através da baixa remoção de DQO bruta (46%). Nos ciclos 11 e 19 houve os maiores consumos de matéria orgânica, o que provavelmente ocorreu devido à formação de novas células, repondo as perdas no processo de desprendimento.

Ainda nos ciclos 1 ao 17, o sistema apresentou comportamento oscilatório, seguido de período de estabilidade nas concentrações, chegando a um mínimo de 4 mg/L de DQO dissolvida no efluente, possivelmente promovido pela adaptação do fungo as condições do meio.

Silva (2009) estudou a influência da presença e ausência de cossustratos em reatores em batelada, utilizando a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN400 na degradação do corante Vermelho do Congo. O cossustrato utilizado foi o etanol, na mesma concentração empregada na presente pesquisa. O autor obteve remoção média percentual de DQO bruta foi de 55%, diferindo do presente trabalho, onde se obteve 99% de remoção no 19º ciclo, sendo a melhor eficiência alcançada atribuída ao fato da espécie fúngica em estudo já está adaptada ao meio.

Segundo Dönmez e Aksu (2001), que estudaram a remoção de íons metálicos em águas residuárias por *candida sp* adaptadas e não adaptados, as células adaptadas são mais eficientes que as não adaptadas. Outro

fator que se pode relacionar é o fato da biomassa neste trabalho ter sido imobilizada em espumas de poliuretano, o que promoveu aumento no percentual de eficiência, já que a formação de biofilme aderido à superfície do suporte geraria a criação de micro-ambientes capazes de garantir a estabilidade das colônias (SILVA, 2009; ALVES, 1999).

A média percentual de remoção de corante obtida foi de 93%. Verificou-se que o 21º ciclo apresentou a melhor eficiência de remoção do poluente (98%) (Figura 1). O emprego do etanol na seguinte pesquisa proporcionou aos micro-organismos boa eficiência de remoção de corante.

De acordo com Dos Santos (2005), a adição de cossustratos é essencial para a remoção da cor em meios contendo azo corantes e, como o etanol é um solvente orgânico capaz de dissolver a camada lipídica da membrana celular (MALLER, 2008), isso pode ter facilitado a entrada do corante para o interior da célula através da membrana celular.

A remoção biológica do corante foi endossada pelos dados obtidos nos procedimentos para estimativa de corante adsorvido no material suporte e no micélio fúngico, constatando-se que havia 0,0001 grama de corante por grama de biomassa e 0,01 grama de corante por grama de material suporte. Uma vez que, ao longo do tempo de operação do reator utilizando etanol, foi removida massa total de 1,01g de corante, o que resultaria em massa de 0,0924 g de corante por massa total de espuma, valor este cerca de 10 vezes superior ao encontrado adsorvido no suporte e 100 superior ao estimado em relação ao corante adsorvido no micélio.

Além disso, foi encontrado 0,033 g de corante adsorvido no micélio, o qual foi estimado em SSV, obtendo-se de 36g de biomassa por grama de espuma, quando do final da operação do reator.

O oxigênio dissolvido (O.D) foi medido para acompanhar o processo de aeração do meio, apresentando valor médio de 7,23 mg/L. Sendo o valor máximo de 8,1 mg/L (10º ciclo) e mínimo de 6 mg/L (20º ciclo).

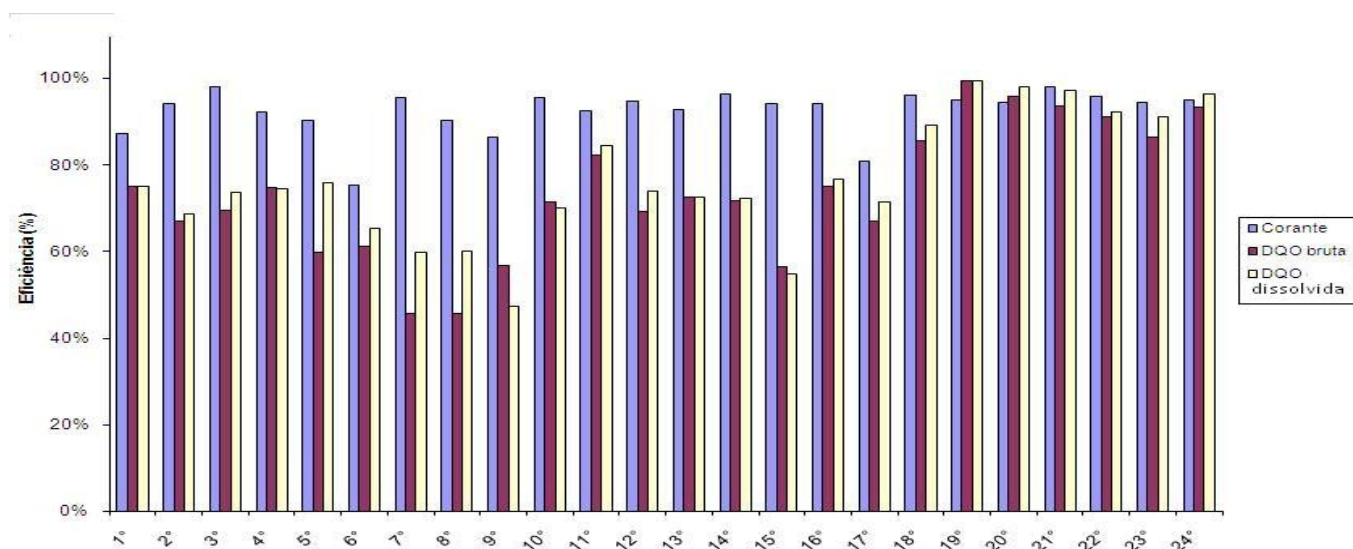


Figura 1 – Comparativo entre eficiência de remoção de Corante e Matéria Orgânica ao longo dos ciclos operacionais do reator em bateladas sequenciais.

A remoção de nitrogênio amoniacal teve eficiência máxima de 31%, correspondente ao 13º ciclo. Entretanto, na maioria dos ciclos, sua remoção foi baixa, o que pode ser explicado pela necessidade de se manter o pH interno da célula em equilíbrio, de modo que há grande liberação de H^+ para o meio externo, cessando a entrada do íon amônio para o meio intracelular (BEVENSEE e BORON, 2008; WOOD *et al.*, 2006).

Houve também pouca remoção de nitrato, sendo o maior percentual de remoção de 77%. Entretanto, quando a mesma ocorreu, foi superior a de amônia. Segundo Pereira (2003), quando fungos filamentosos não consomem amônia como fonte primária de nitrogênio, recorrem ao nitrato e utilizam-se das enzimas *nitrato* e *nitrito redutase* para chegar a NH_4^+ no interior da célula.

É possível que o *A. niger* tenha superestimado sua necessidade metabólica por nitrogênio, tendo que liberar os compostos nitrogenados armazenados em seus vacúolos para o meio, o que pode ter contribuído para o

aumento das concentrações de amônia e nitrato no ambiente (RODRIGUES, 2006). Da mesma forma, o nitrogênio presente na molécula do corante poderia ter suprido as necessidades dos micro-organismos por esse nutriente.

Já os valores de nitrito são muito baixos no efluente, comprovando que este está presente em etapa de transição de nitrato a amônia, apresentando remoção média de 82%.

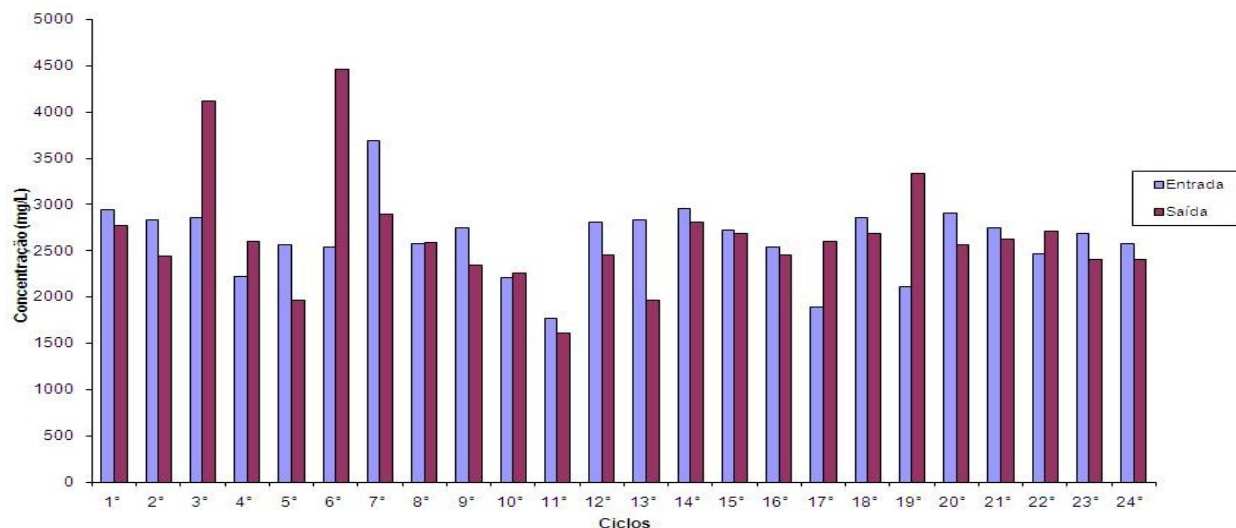


Figura 2 – Variação da concentração de amônia no meio ao longo dos ciclos operacionais do reator em bateladas sequenciais.

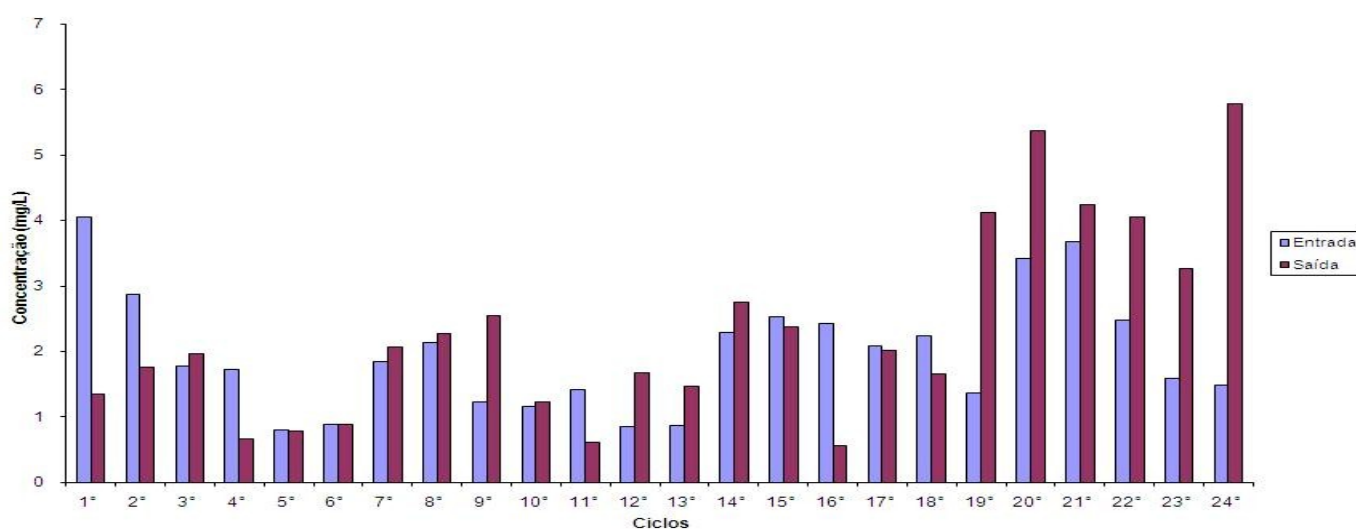


Figura 3 – Variação da concentração de nitrato no meio ao longo dos ciclos operacionais do reator em bateladas sequenciais.

O fósforo é um macronutriente indispensável ao desenvolvimento de micro-organismos, pois participa de funções metabólicas essenciais destes (JENNINGS, 1995). Os ciclos de fósforos apresentaram oscilação entre remoção e liberação, se mostrando bem acentuada nos ciclos 17 e 24. No ciclo 17, foi observada a máxima eficiência de remoção equivalente a 32%, apresentando concentração de 34 mg/L no afluente e 23 mg/L no efluente.

Já o ciclo 24, foi caracterizado pela liberação do nutriente fósforo total que possuía concentração inicial de 28 mg/L e final de 35 mg/L. Isso pode ser explicado pelo fato de que em determinados momentos, o fungo absorva o nutriente para utilizar em seu metabolismo, armazenando-o em vacúolos, sendo que pode liberá-lo ocasionalmente para o meio para manutenção do equilíbrio celular ou como resposta ao seu metabolismo (LI e KANE, 2008).

Em relação ao ortofosfato, também foi observado pouca diminuição da concentração do nutriente no meio, sendo observada pouca melhora na sua remoção durante o experimento. O ciclo 11 apresentou a maior quantidade de ortofosfato liberado no meio, apresentando grande diferença entre o afluente de concentração 7,5 mg/L e o efluente de concentração 16 mg/L.

4 CONCLUSÃO

Embora não se tenha alcançado bons percentuais na remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo), apresentando-se instável, a utilização do *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo de reator em bateladas sequenciais, utilizando 0,5 g/L de etanol como cossubstrato, mostrou-se eficiente na remoção do corante Vermelho do Congo, com remoção máxima de corante de 98% (ciclos 3º e 21º), sendo a remoção média, obtida no final dos ciclos em estudo, de 93%. A remoção média de matéria orgânica bruta foi de 74% e a dissolvida 77%. Estes resultados mostraram que o etanol pode ser viável como cossubstrato visando à remoção do vermelho do congo e de matéria orgânica carbonácea em reatores com fungos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao CNPq – Brasil pelo apoio financeiro (Edital Jovens Pesquisadores no. no. 567552-2008).

REFERÊNCIAS

ALVES, M.M. A new device to select microcarriers for biomass immobilization to an anaerobic consortium. *Water Environment Research*, v. 71, n. 2, p. 209 – 217, 1999.

APHA – AWWA – WEF Standard methods for the examination of water and wastewater 19th, Washington DC, USA, 1999.

BEVENSEE, M. O., BORON, W. F. Control of intracellular pH: in *The kidney*. Seldin and Giebisch's. 4th edition, p. 1429 – 1480, 2008.

CHANDER, M., ARORA, D. S.. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes and Pigments* 72 (2007) 192-198.

CHAVES, L. C. D. Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contacto com Água Potável. 2004.

Dönmez, G., Aksu, Z.. Bioaccumulation of copper(ii) and nickel(ii) by the non-adapted and adapted growing *CANDIDA SP.* *Water Research*, Volume 35, Issue 6, April 2001, Pages 1425-1434

Dos SANTOS, A.B. APPLICABILITY OF BOTH THERMOPHILIC TREATMENT BY ANAEROBIC GRANULAR SLUDGE AND REDOX MEDIATORS ON COLOUR REMOVAL OF TEXTILE WASTEWATERS. Vol.10 - Nº 3 - jul-set 2005, 253-259

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, P. 510, 2004.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 2, p. 139-145, 2002

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 458p., 1994

HANSEN, L., LOPES, W., RUSCHEL, C. K.. Biorremediação - utilização do fungo *Aspergillus niger* no tratamento de efluentes. 24ª Mostra Internacional de Ciência e Tecnologia. 2009. (Fonte: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2010/01/os-caca-corantes>).

IKEDA, Y.; PARK, E.Y.; OKUDA, N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 8, p. 1030-1035, 2006.

JENNINGS, D. H. *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge: University, 1995. 595p.

LI, S. C., KANE, P. M.. The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1793, Edição 4, Abril/2009, p. 650-663.

MALLER, A. Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niger*. Ribeirão Preto, 2008. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, 2008.

PEREIRA, J. F. et al.. Nitrato Redutase em Fungos Filamentosos. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* – Ed. nº 31, julho/dezembro 2003.

REIS, L.G.T. Degradação do corante Vermelho do Congo em Solução Aquoso Através de Plasma Obtido por Eletrólise de Alta Tensão. Viçosa, MG, 2009.

RODIER, J. L' analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux residuais, eaux de mer. Paris: Dunod, 1975. 629 p.

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.

SILVA, K. M. L., Remoção de Corante Têxtil por Uso de Reatores em Batelada Inoculados com Fungos. (Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Tecnologia em Gestão Ambiental). 85 páginas. 2009.

SILVA FILHO, H. A. et al.. Ensaios de Toxicidade e Remoção de Corantes Têxteis por Processo Biológico. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - PB – 2006.

VASSILEV, et al.. Olive mill waste water treatment by immobilized cell of *Aspergillus niger* and its benrichment with soluble phosphate. *Process Biochemistry*. V. 32, n 7, p. 617-620. 1997.

WANDERLEY, C. R. P. *Aspergillus niger* NA 400 como inóculo em reatores em batelada para remoção de corante vermelho do congo em meio aquoso sintético. 84f. Tese (Mestrado em Engenharia Civil, área de Saneamento Ambiental- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

WOOD, C. C., PÓREE, F., DREYER, I., KOEHLER, G. J., UDVARDI, M. K. Mechanism of ammonium transport, accumulation and retention in oocytes and yeast cells expressing Arabidopsis atAMT1;1. *FEBS Letters*, v. 580, p. 3931 – 3936, 2006.

YAYKAŞLI , K. O.; DEMIREL, G.; YAŞAR, A. Influence of alcohols on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. *Journal of Food Engineering*, v. 70, n. 4, p. 518-522, 2005

YESILADA, O., ASMA, D., CING, S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 933 – 938, 2003.