

UTILIZAÇÃO DE *Aspergillus niger* AN 400 COMO INÓCULO DE REATORES EM BATELADA AGITADA PARA BIODEGRADAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA SINTÉTICA CONTAMINADA COM METIL PARATION

Rejane de Souza Paulino (*), Jéssica Karine do Carmo Braga, Barbara Chaves Aguiar Barbosa, Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa, Glória Maria Marinho Silva

* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará. E-mail: rejanessouzap21@gmail.com

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliado a remoção do pesticida metil paration em água residuária sintética, em reatores em batelada agitada, utilizando o fungo da espécie *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo. A presente pesquisa foi dividida em três etapas: cultivo, produção e contagem do inóculo; preparação da solução padrão de metil paration e da água residuária; e operação dos reatores em batelada dispersa sob agitação de 80 rpm. Os reatores foram divididos em dois lotes: reatores de controle (RC) contendo apenas a água residuária, e em reatores com fungo e metanol (RF) contendo a água residuária, suspensão fúngica e metanol como cossubstrato, na concentração de 63,04 mg/L. As variáveis analisadas foram pH, amônia, nitrato, DQO e metil paration. Foi observado inicialmente um pH de 4,3 e remoções de máximas de 31,7% de amônia e 40,3% de nitrato, ambos em um tempo reacional de 192 h, além de uma eficiência de remoção de 23% de DQO no tempo reacional de 24 h, e 32% de remoção do pesticida metil paration no ultimo tempo de reação. Os resultados obtidos nesta pesquisa, mostram a viabilidade dos fungos na biodegradação do pesticida metil paration, que é um poluente persistente no meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger* AN 400, biodegradação, metil paration, água residuária.

INTRODUÇÃO

Os pesticidas desempenham um papel fundamental na agricultura moderna, visto que são eficazes no controle de pragas, promovendo um aumento na produtividade e qualidade dos alimentos. Contudo, o aumento intensivo das atividades industriais tem acentuado a poluição ambiental por esses compostos, uma vez que ocasionam a disposição inadequada e abusiva dos resíduos perniciosos, trazendo assim sérios problemas para a saúde humana e para os ecossistemas naturais (NETO, 2012; SOARES *et al.*, 2011; SILVA, 2013).

O composto Metil Paration (MP), também chamado de paration-metílico ou parathion, é um pesticida pertencente a classe dos organofosforados, que foi introduzido no mercado no início do ano de 1950 e foi amplamente utilizado como inseticida agrícola devido à sua alta eficiência e baixa bioacumulação. No entanto, por causa da sua alta toxicidade o Metil Paration tem sido classificado como um inseticida 'extremamente perigoso' pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e seu uso tem sido restringido em muitos países, devido se apresentar altamente toxico para os organismos não-alvo, incluído os seres humanos (ALVARENGA *et al.*, 2014).

Nesse contexto, diversas técnicas e pesquisas buscam através de iniciativas tecnológicas solucionar o problema com os compostos organofosforados sobre o meio ambiente. Dentre as inúmeras tecnologias, destaca-se a biorremediação, que consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos, que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes. Nesse campo, os fungos vêm mostrando-se organismos promissores, uma vez que, são espécies capazes de sobreviver e crescer em elevadas concentrações de compostos recalcitrantes, além de serem capazes de utiliza-los como fonte de energia, e produzir enzimas extracelulares (JACQUES, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Diante dessas informações, a presente pesquisa buscou avaliar a capacidade de remoção do pesticida metil paration em água residuária sintética através do uso de reatores em batelada agitada, utilizando o fungo *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo, sob rotação de 80 rpm.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Ambiental no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (LATAM), sendo a pesquisa realizada em 3 etapas consecutivas.

Cultivo, produção e contagem do inóculo (*Aspergillus niger* AN 400)

Os esporos de *Aspergillus niger* AN 400 foram cultivados em placas de Petri estéreis contendo 15 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose, previamente esterilizadas a 121° C, durante 20 minutos. As placas permaneceram em uma temperatura média de $\pm 28^{\circ}$ C, durante sete dias em uma estufa bacteriológica, afim de haver o crescimento dos esporos por toda a superfície. A remoção dos esporos das placas de Petri foi realizada com uma alça de Drigalsky e solução de Tween 80.

Para a contagem dos esporos foi preparada uma solução utilizando 50 μ L de suspensão de esporos, previamente agitada em agitador tipo Vórtex, acrescido de 950 μ L de solução Tween 80, resultando em diluição de 1:20. Em seguida, 20 μ L da solução preparada foram transferidos para cama de Neubauer, em que se realizou a contagem dos esporos em microscópio óptico Bioval.

Preparo da solução padrão de metil paration e da água residuária sintética

Foi preparado um litro de solução padrão de metil paration, com uma concentração de 1500 ppm, com 400 ml de metanol (316,72 mg/L), e o restante de água destilada. A água residuária que alimentou os reatores, por sua vez, foi preparada também com água destilada, acrescida de 1 mL/L de Vishniac, e o pesticida metil paration, com concentração de 7,01 mg/L.

Operação em reatores em batelada dispersa sob agitação

Foram montados exatamente 28 reatores, sendo 14 reatores de controle (RC) e 14 reatores contendo fungo (RF), usando erlenmeyers com volume total de 250 mL e volume útil de 150 mL, esterilizados em autoclave e fechados com papel alumínio e TNT. O experimento foi realizado em um agitador rotatório com velocidade de 80 rpm, a aproximadamente, $\pm 30^{\circ}$ C. Os reatores foram envolvidos com papel jornal para evitar a fotodegradação do meio a ser analisado. A batelada foi conduzida em duplicata, nos tempos de reação de 0 h, 24h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, 168 h e 192 h.

As variáveis analisadas foram pH (potencial hidrogeniônico), DQO (Demanda Química de Oxigênio), amônia, nitrato e metil paration, de acordo com APHA (2005), exceto metil paration cuja determinação foi realizada por cromatografia líquida Shimadzu (20A Prominence) com detector por arranjo de diodo (SPD-020A), duas bombas (LC-20AT) com eluição isocrática (Acetonitrila/água 70/30%) e fluxo 1mL/min, forno (CTO-20A), degaseificador (DGU-A3), com tempo de retenção de 7 minutos e coluna Hichrom 5 C18, 25 cm x 4,6 mm, conforme Sampaio (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Potencial Hidrogeniônico (pH), Amônia e Nitrato

No presente estudo, verificou-se que não houve degradação nos reatores de controle (RC), logo os mesmos não serão analisados. Com isso, todos os dados apresentados a seguir serão referentes aos reatores contendo fungo (RF).

O pH inicial do meio foi de 4,3 (Figura 1), estando este valor em uma faixa ótima, já que para o crescimento do fungo *Aspergillus niger* AN 400 o potencial hidrogeniônico ideal se encontra entre 3,3 – 7,5 (MARINHO e RODRIGUES, 2012).

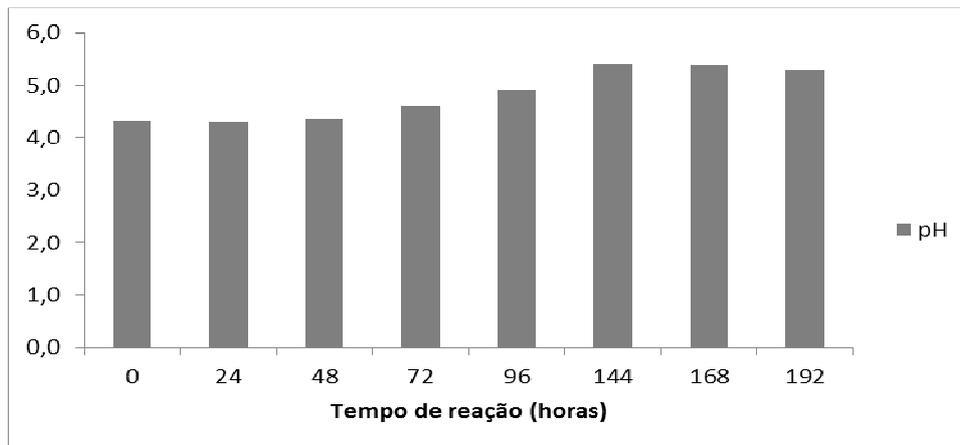


Figura 1: Gráfico da variação do pH durante o tempo de reação. Fonte: Autores (2014).

Durante as primeiras 72 horas verificou-se pouca variação do pH, o que segundo Silveira (2013) é indício de que não houve contaminação por outros micro-organismos que interferissem na acidez ou basicidade do meio, mediante a ação de atividade metabólica. Entretanto, a partir do tempo de 96 horas averiguou-se um pequeno aumento no potencial hidrogeniônico, que pode ter ocorrido devida ao consumo de ácidos, sendo que entre o tempo de reação de 144 – 192 horas sucederam pequenos decaimentos, que podem ser explicados pela produção de ácidos orgânicos, bem como o consumo de sais, como cloreto de amônio (RODRIGUES, 2006).

A maior taxa de remoção de amônia foi de 31,7% (Figura 2) e de nitrato de 40,3% (Figura 3), ambos no tempo reacional de 192 horas. Observou-se que a remoção de amônia e nitrato ocorreram em todos os tempos de reação o que pode ser indicativo de uma assimilação simultânea do nitrato e da amônia pela espécie *Aspergillus niger*, uma vez que a mesma é capaz de consumir simultaneamente tanto a amônia quanto o nitrato, porém com velocidades distintas de consumo, uma vez que a velocidade de consumo do nitrogênio amoniacal é superior ao consumo de nitrato, o que nesta pesquisa ocorreu de maneira inversa, visto que, no tempo reacional de 192 horas o consumo de nitrato foi superior ao de amônia. Além disso, foi verificado acréscimo das concentrações tanto da amônia quanto de nitrato em alguns tempos de reação, possivelmente como resultado da liberação dos mesmos pelos vacúolos dos organismos, uma vez que os vacúolos podem liberar nutrientes e materiais de reserva em resposta ao metabolismo do microrganismo (LEITE *et al.*, 2006; MARINHO e RODRIGUES, 2012).

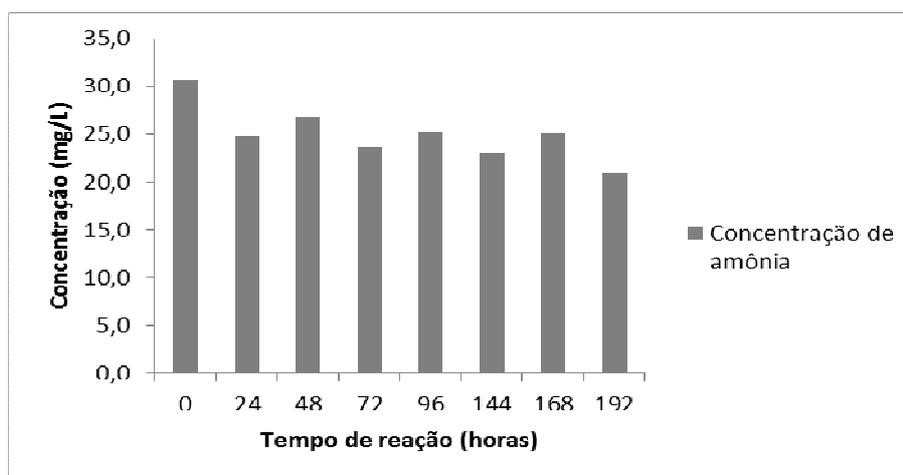


Figura 2: Variação das concentrações de amônia ao longo dos tempos de reação. Fonte: Autores (2014).

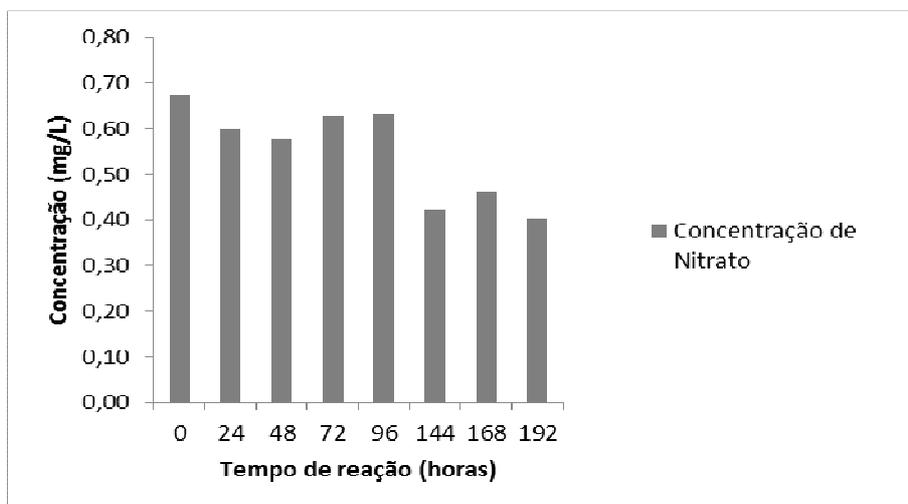


Figura 3: Variação das concentrações de nitrato ao longo dos tempos reacionais. Fonte: Autores (2014).

Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Metil Paration

As variações da concentração da matéria orgânica, quantificada através da análise de DQO, estão representadas na figura 4.

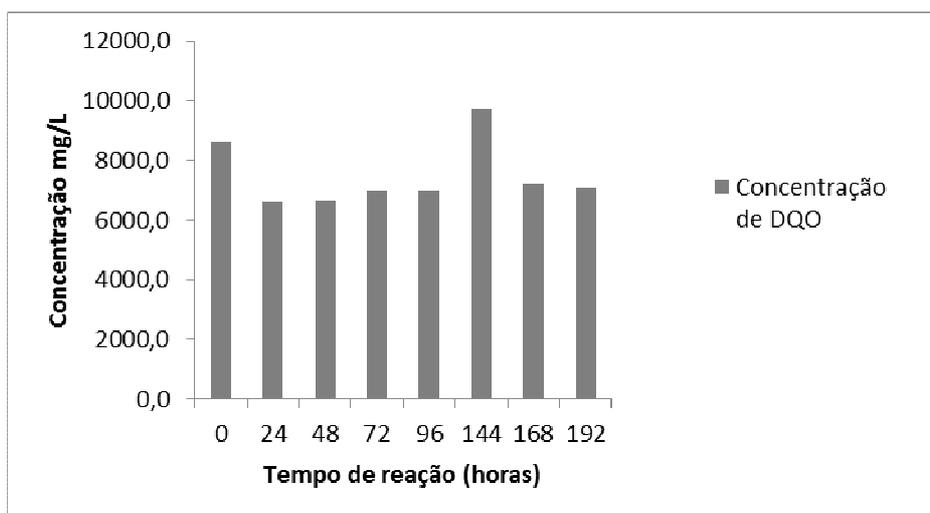


Figura 4: Gráfico da variação da concentração de DQO durante o tempo de reação. Fonte: Autores (2014).

A maior eficiência de remoção foi de 23%, no tempo reacional de 24 horas, havendo a partir desse período aumentos na concentração da matéria orgânica, o que poderia estar relacionado à grande disponibilidade de fonte de carbono no meio, 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).

About-Zeid *et al.*, (1983), estudaram a produção de proteínas de células únicas (SCP-s) usando o metanol como única fonte de carbono para o crescimento de micro-organismos, especialmente fungos. Percebendo que em altas concentrações de metanol, o mesmo tornava-se tóxico para o desenvolvimento e assimilação dos organismos. Soares *et al.*, (2011), por sua vez, em uma revisão sobre biodegradação de áreas degradadas por meio de fungos, esclareceu que poucos estudos relacionam o metanol com compostos BTEX, além de evidenciar que a maior persistência dos BTEX em presença de metanol é causada pela inibição da biodegradação, ocasionada pela alta concentração de metanol e também devido à remoção de oxigênio pela biodegradação do metanol.

Silveira (2013), utilizando glicose, nas concentrações de 3-5-10 mg/L, como fonte de carbono, afim de verificar a influência do aumento do cossustrato na remoção do composto 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) em regime de batelada sequencial com biomassa dispersa, observou que em altas doses de glicose não houveram favorecimento nas reduções de concentrações de matéria orgânica, com apenas 0,38% de remoção da mesma no reator contendo fungo e glicose a 10 mg/L.

Nos estudos mencionados, é evidente a influência do aumento da concentração do cossustrato no meio para o desenvolvimento dos microrganismos, o que indica que as baixas remoções de matéria orgânica observadas no presente trabalho, podem ser uma consequência do uso de excesso do cossustrato metanol (63,04 mg/L) no meio, no entanto, tais questões devem ser investigadas.

Em relação ao pesticida metil paration a taxa de remoção mais alta se deu no tempo de reação de 192 horas, com aproximadamente 32% (Figura 5), em contra partida os menores índices ocorreram nos tempos de 48 e 96 horas, com percentuais de 13% e 18%, respectivamente.

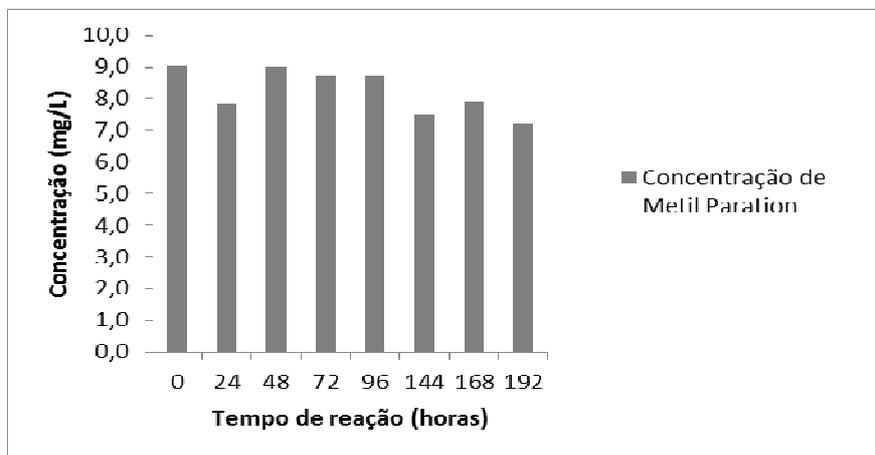


Figura 5: Gráfico da variação da concentração do pesticida metil paration. Fonte: Autores (2014).

Tais remoções podem estar associadas, assim como os percentuais baixos de remoção de matéria orgânica, pela pouca quantidade de biomassa produzida nos reatores, pois segundo Kyriacou *et al.*, (2005), a atividade microbiana pode ser relacionada de forma direta a quantidade de biomassa produzida no meio, uma vez que a concentração de microrganismos dentro de um reator é fundamental para o tratamento de água residuária, ou seja, quanto maior a população microbiana, maior será também a eficiência de remoção do poluente para uma dada concentração, visto que à medida que a população de microrganismos aumenta, há menor disponibilidade de alimento para os mesmos.

Em um experimento em batelada, Sampaio (2005) verificou a remoção dos pesticidas metil paration (25 mg/L) e atrazina (11,3 mg/L) por *Aspergillus niger* AN 400, utilizando água sintética com e sem glicose (0,5 g/L). Concluiu que a presença da glicose como cossustrato foi de fundamental importância para os percentuais de remoção do metil paration, quando comparados com os que não continham substrato primário. Isto é, a utilização do cossustrato em medida adequada para o meio, o torna fator essencial para a obtenção de uma máxima eficiência de remoção.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa permitiram concluir que o tratamento biológico utilizado com reatores em batelada agitada, aplicando *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo, mostrou-se eficiente, uma vez que o meio continha condições adequadas de pH para o crescimento do fungo, sendo a alta concentração de metanol (cossustrato) e as pequenas quantidades de biomassa encontrada nos reatores, os prováveis responsáveis para as baixas taxas de remoção. Não obstante, tais questões devem ser investigadas, recomendando-se o teste de outras concentrações menores do cossustrato metanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-ZEID, A.; BAGHLAF, A. Methanol as the Carbon Source of Production of Single-Cell Proteins (SCP-s). **Zentralblatt für Mikrobiologie**, vol. 138, p. 451-464, 1983.
2. ALVARENGA, N.; BIROLI, W. G.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. **Chemosphere**, v. 117, p. 47-52, 2014.
3. APHA/AWWA/WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st edition. Washington, D.C. American Health Association, 2005.
4. JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 280-287, 2010.
5. KYRIACOU, A. et al. Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 1404 – 1408, 2005.
6. LEITE, C. L.; GROSPOSO, C.; SANTOS, E. R. D.; FIGUEIREDO, N. F.; GODINHO, P. S.; ABRÃO, R. L. A. A particularidade de ser fungo – I. Constituintes celulares. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17-27, 2006.
7. MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Fungos e Águas Residuárias Industriais: Nova Tecnologia**, coordenação Laboratório de Tecnologia Ambiental do IFCE. Recife: Imprima, 2012.
8. NETO, A. S. **Estudo da degradação de água residuária sintética dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina em reatores em batelada inoculados com a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Fortaleza, 2012.
9. OLIVEIRA, E.C. *et al.* **Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo**. In: Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2006. p. 133-148.
10. RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
11. SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de Metil paration e Atrazina em reatores de bancada com fungos**. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
12. SILVA, N. A. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
13. SILVEIRA, R. B. **Degradação do 2,4 – dinitrofenol (2,4 – DNF) por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em batelas**. Dissertação. (Mestrado), 2013.
14. SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. **Fungos na biorremediação de áreas degradadas**, p. 341-350, 2011.
15. WITTEVEEN, **Gluconato formation and polyol metabolism in *Aspergillus niger***. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 1993.