

## DEGRADAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA DE ÁGUA SINTÉTICA DOPADA COM PARAQUAT POR FUNGO

Márcia Gabrielle Apolinario (\*), Germana Maria Marinho, Kelly Rodrigues, Rinaldo dos Santos Araújo, Glória Marinho.

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceara-Campus Maracanaú, gabriellemga@gmail.com.

### RESUMO

O uso de pesticidas na atividade agrícola em função de uma demanda maior por alimentos em tempo menor e garantia da produção tem tornado seu uso cada vez mais intenso. Decorrente dessas ações, estes têm aumentado a sua concentração no solo e no ambiente aquático. Os tratamentos utilizando micro-organismos para a remoção desses compostos do meio ambiente são uma alternativa viável tanto por sua eficiência e como pelo custo, uma vez que, os tratamentos tradicionais não possuem uma ação tão efetiva na sua remoção. O fungo *Aspergillus niger* AN 400 é uma espécie que tem se mostrado eficiente na degradação varias substâncias persistentes, por isso, foi escolhido para a realização da pesquisa, como agente biodegradador. Os resultados de DQO ficaram acima de 60% e as remoções dos compostos nitrogenados: nitrato (30%), amônia (10%) e nitrito (20%).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aspergillus niger* AN 400, Paraquat, Biotratamento.

### INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico da indústria química possibilitou a síntese de compostos orgânicos mais eficientes às espécies ditas de “pragas” pelo homem. O uso destas substâncias mais conhecidas como pesticidas, agroquímicos, insumos agrícolas, biocidas tiveram seu uso indiscriminado sem se conhecerem o efeito deletério que poderiam provocar.

O crescimento exponencial da população mundial tem gerado a necessidade de produzir alimentos em quantidades maiores a cada ano e com um tempo de cultivo menor. Nesse sentido, a busca por mecanismos capazes de proporcionar uma maior produção agrícola, tem sido utilizada em grande proporção, como, por exemplo, máquinas agrícolas, manipulação genéticas e pesticidas.

A fim de garantir os índices de produtividade e uma menor redução da produção agrícola, o uso de pesticidas se intensifica a cada ano. Os pesticidas são usados para deter, inibir e aniquilar as “pragas” que atacam as plantações, causando danos às colheitas, diminuindo a oferta de alimentos.

São utilizados em todo o mundo em grande quantidade e muitas vezes de forma indiscriminada e abusiva. Vários pesticidas são usados simultaneamente e/ou misturados para potencializar a sua ação, provocando um maior grau de contaminação (PINO e PEÑUELLA, 2011) no ecossistema que são lançados.

Os pesticidas por seu caráter tóxico podem ser cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizar hormônios (COLBORN et al,1997). São persistentes no ambiente, contaminando solo e águas superficiais e subterrâneas. A potência e magnitude do efeito causado pelos pesticidas dependem das transformações e transferências que ocorrem em cada compartimento do sistema solo-água-plantas-atmosfera.

A concentração de pesticidas encontrados na água vem crescendo de forma contínua, sendo herbicidas e inseticidas os comumente encontrados em águas superficiais devido a sua grande utilização na agricultura e em zonas habitacionais (LIU et al., 2009). Sendo o paraquat um herbicida não seletivo utilizado em muitos países em culturas de fumo, arroz, algodão, soja, uva entre outras. Possui alta persistência no ambiente e alta solubilidade na água facilitando a contaminação deste, no meio.

Fungos e bactérias são os mais importantes transformadores e degradadores de pesticidas da comunidade microbiológica (DIEZ, 2010). Fungos biotransformam pesticidas e outros xenobioticos através da introdução de pequenas mudanças na sua estrutura molecular (DIEZ, 2010). Muitos fungos têm sido testados por sua habilidade de degradar pesticidas, destacando os causadores da podridão-branca.

Várias espécies de fungos têm sido utilizadas para a degradação de diversos poluentes. Fungos secretam uma grande diversidade de eficientes enzimas (celulases, protease, amilase, lipase, entre outras) no ambiente que são utilizadas para auxiliar sua nutrição, essas características lhes conferem a capacidade de degradar tanto materiais naturais, refinados ou

processados. Eles também são capazes de suportarem variações de Ph e temperatura, mudanças bruscas nas concentrações de matéria orgânica e se adequar a escassez de umidade e de oxigênio.

O *Aspergillus niger* é conhecido, principalmente, por sua habilidade em produzir enzimas e ácidos orgânicos por fermentação, especialmente, ácido cítrico. A espécie de fungo filamentosos *Aspergillus Níger*, possui eficiência comprovada para degradação de compostos recalcitrantes em efluentes de indústria de azeite de oliva, indústria de castanha de caju, cervejarias, e em água para remoção do pesticida agrícola paration (GARCIA *et al*, 2000; HERNÁNDEZ *et al*, 2006; SAMPAIO *et al*, 2002).

## PARAQUAT

Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) é um herbicida viologeno, com toxicidade classe I, não seletivo utilizado em larga escala em mais de cem países em culturas de fumo, arroz, algodão, soja, uva entre outra. Possui alta persistência no ambiente e alta solubilidade na água facilitando a contaminação deste meio.

É um composto quartenário do amônio utilizado como herbicida e altamente perigoso para os humanos, caso ingerido. Esse composto sólido cristalino é instável em meio alcalino, solúvel em água, pouco solúvel em álcool e insolúvel em solventes orgânicos não polares (International Programme on Chemical Safety - PISQ, 2001).

O paraquat é um composto extremamente tóxico, podendo causar intoxicações fatais em humanos e animais. No homem, ele pode ser reduzido pela enzima NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) - citocromo P450 redutase, com a transferência de um elétron, formando o radical paraquat.

Este, por sua vez, em presença de oxigênio oxida-se rapidamente produzindo um ânion radical superóxido e regenerando o paraquat. Desta maneira, ciclos repetidos de redução e re-oxidação do herbicida podem ocorrer gerando uma grande quantidade de espécies de oxigênio reduzido que levam o organismo ao stress oxidativo ou à peroxidação de gorduras (SOUSA & MACHADO, 2003). Na Figura 1 está mostrada a estrutura molecular do paraquat.

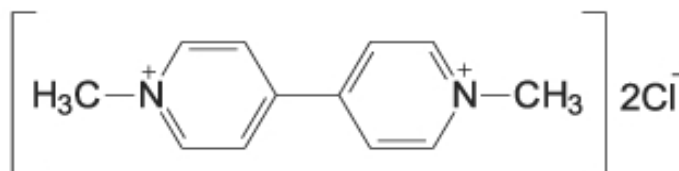


Figura 1-Estrutura molecular do pesticida paraquat

Fonte: Sousa & Machado (2003).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### CULTIVO, PRODUÇÃO E CONTAGEM DOS ESPOROS DE *Aspergillus niger* AN 400

Os esporos de *Aspergillus niger* AN 400 foram produzidos em placas de Petri estéreis contendo 15 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose, previamente esterilizado a 121°C, durante 15 minutos, e 1 mL de solução de Vishniac (EDTA 10,0 g/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4,40 g/L, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1,00 g/L, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,32 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0,22 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1,47 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,00 g/L), 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 transferidos para câmara de Neubauer, onde se procedeu à contagem dos esporos em microscópio óptico Bioval com aumento de 400 vezes.

## IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa foi imobilizada em cubos de poliuretano (meio suporte) com 1 cm de aresta, totalizando 15 g, acondicionados em três redes de polietileno dentro do reator (Figura 2). O meio suporte foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

O reator foi preenchido com 4 L do meio sintético (  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g/L,  $\text{NaNO}_3$  0,25 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,20 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,25 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,08 g/L,  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  0,05 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,05 g/L,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  0,05 g/L,  $\text{ZnSO}_4$  0,04 g/L) e glicose na concentração de 1,0 g/L. Logo depois do preparo do meio sintético, o meio foi transferido para o reator e inoculou-se a solução de esporos, na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL.

A imobilização teve duração de 7 dias, e a cada três dias o meio sintético era trocado para melhor crescimento do fungo. O reator foi mantido em uma câmara de fluxo laminar, para evitar contaminação do meio.



Figura 2: Imobilização da biomassa fúngica dentro do reator.  
Fonte: Autores (2014).

## MONTAGEM E OPERAÇÃO DO REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL COM BIOMASSA IMOBILIZADA

O reator consistia de um recipiente de vidro e possuía volume total de 5 L e volume útil de 4 L, vedado com tampa plástica específica. O ar era fornecido por mini-compressores e a alimentação foi a partir da água residuária sintética preparada.

O reator foi operado por 10 ciclos, com TR (tempo de retenção) de 12 horas. No início de cada ciclo, a água residuária sintética era renovada.

O volume amostral retirado em cada ciclo para a realização das análises de amônia, nitrito e nitrato foi de apenas 10% do volume útil do reator por ciclo estudado. Os tempos reacionais foram 0 hora e 24 horas. As análises foram feitas utilizando os métodos descritos por APHA (2005).

## ÁGUA RESIDUÁRIA SINTÉTICA

A água residuária sintética foi preparada com água de torneira, acrescida de 1 ml/L de Vischiniac (solução de nutrientes), 0,5 mg/L de glicose e os pesticidas: paraquat na concentração de 30 mg/L.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Ph

Na Figura 3 estão mostrados os resultados de Ph para TR de 24h.

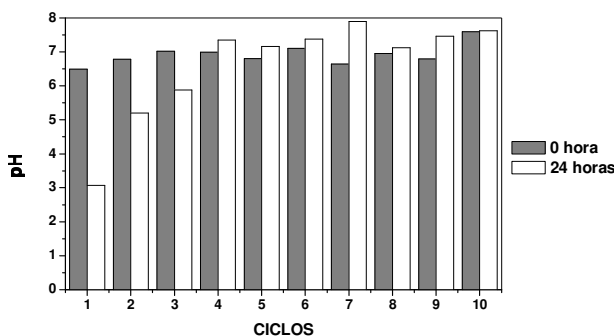


Figura 3: Variação do Ph em função do tempo.

Fonte: Autores (2014).

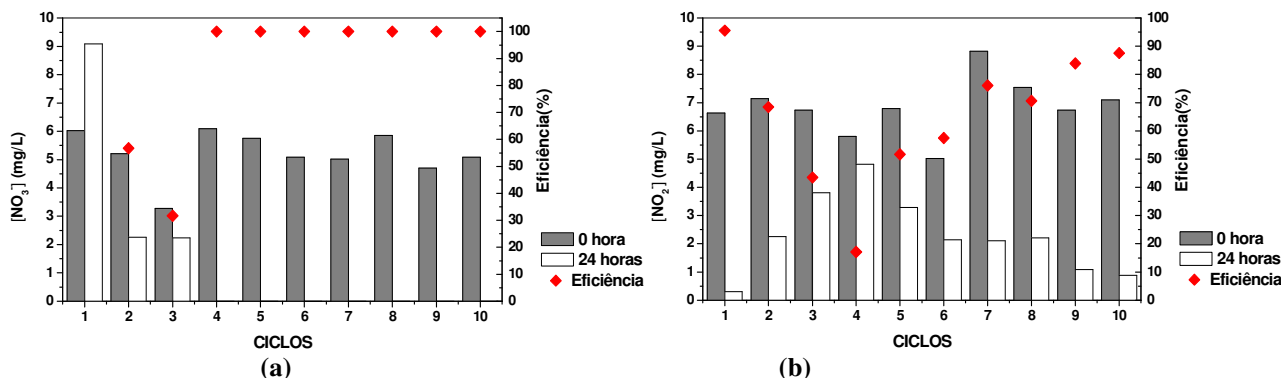
Os valores de Ph variaram na faixa de 3,0 a 7,9 (Figura 3). No 1º ciclo, notou-se que a variação foi brusca com diminuição do Ph do momento da caracterização com 6,49 a 0 hora do ciclo 1, chegando à faixa ácida com 3,07 e aumento no 2 e 3 ciclos com valores de 5,2 e 5,80, respectivamente.

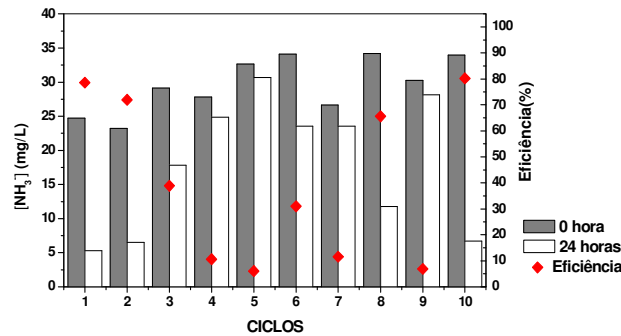
Nos ciclos seguintes, observou-se comportamentos semelhantes havendo um aumento de Ph no ciclo 4, para 7,35, chegando a uma faixa quase constante de valores nos ciclos seguintes. Segundo Griffin (1994), o Ph ótimo para o desenvolvimento de vários fungos encontra-se na faixa entre 4,0 e 6,0, porém, a maioria dos fungos filamentosos tolera variações de Ph entre 2,0 e 9,0. Portanto, o valor registrado no reator nesta pesquisa encontra-se nesse intervalo de tolerância.

Bakhtiari (2006) e colaboradores mostraram em seus estudos de produção de uréase, utilizando *Aspergillus niger* PTCC5011, que o acréscimo de glicose e sacarose no meio basal, acumula a produção de ácidos no meio. Lopes *et al* (2011), através de seu estudo de remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por uso de reator aeróbio em batelada com inoculo fúngico, também verificou elevação do Ph no final dos ciclos estudados. Os autores atribuíram isso, ao provável consumo dos ácidos orgânicos produzidos pelo fungo após a exaustão do cosubstrato.

Assim, neste trabalho, os Phs abaixo de 7 são ocasionados pela produção e acumulação dos ácidos produzidos nos três primeiros ciclos, e o aumento da eficiência do fungo em consumir o cosubstrato fornecido ao longo dos ciclos e consequentemente o consumo dos ácidos orgânicos, ocasiona o aumento do Ph e comportamento constante nos ciclos seguintes.

Na Figura 5 estão mostrados os resultados de nitrato, nitrito e amônia para TR de 24h.





(c)

Figura 4-Variação de (a) nitrato, (b) nitrito e (c) amônia em função do tempo.  
Fonte: Autores (2014)

O fungo, *Aspergillus niger*, produz enzimas do tipo nitrato redutase e nitrito redutase que convertem nitrato a nitrito e nitrito a amônia, mostrando-se dessa forma ser capaz de degradar compostos nitrogenados como o pesticida paraquat que contem em suas moléculas nitrogênio, como podemos observar na Figuras 1.

De acordo com a Figura 4, a concentração de nitrato no reator teve diminuição significativa na maioria dos ciclos, sendo observada a produção ou liberação desse nutriente apenas no 1º ciclo. O aumento de nitrato possa, em parte, estar relacionado à sua liberação pelas células fúngicas, uma vez que estes micro-organismos podem armazená-lo, assim como outros nutrientes, excretando-os para o meio externo sempre que requerido, em resposta às necessidades metabólicas dos fungos (LEITE *et al.*, 2006).

A conversão do nitrato a nitrito por ação da enzima nitrato redutase, mostra que no 1º ciclo o consumo de nitrito é de 95,54%, como há produção de nitrato o nitrito consumido é exclusivo do efluente. Nos ciclos seguintes com a conversão do nitrato a nitrito, a concentração do nitrito disponível aumenta, conforme o nitrato é consumido, e conseqüentemente convertido à amônia por meio da enzima nitrito redutase.

A maior remoção de amônia foi de 80,21% no 10º ciclo e os menores foram no 4º, 5º e 9º ciclos sendo 10,66%, 6,06% e 6,90%, respectivamente.

Os fungos como o *Aspergillus niger* podem utilizar tanto amônia quanto nitrato simultaneamente (SANGTIEAN & SCHMIDT, 2002), explicando o consumo quase em sua totalidade de nitrato nos ciclos, enquanto a utilização da amônia não foi tão significativa em comparação com a do nitrato.

Na Figura 5 estão mostrados os resultados de DQO para TR de 24h.

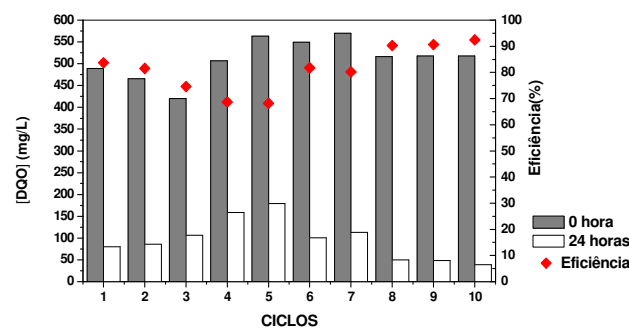


Figura 5: Variação do DQO em função do tempo e eficiência.

Fonte: Autores (2014).

Os valores de remoção de DQO observados na Figura 7 mostram a utilização do substrato e cossustrato fornecido ao fungo, pelo decaimento nas concentrações da matéria orgânica mensurada em termos de DQO, concluindo-se que a atividade enzimática do fungo está sendo eficiente em degradar o pesticida estudado, presente na matéria orgânica.

A maior remoção de DQO foi ao ciclo 10, sendo 92,47% e as menores no ciclo 4 e 5 com 68,7% e 68,20%, respectivamente.

Na Figura 7 pode-se averiguar que do 1º ao 3º ciclo há grandes variações e decréscimo nas eficiências de remoção de DQO, logo após a remoção é constante e crescente, isso se deve a variação nos valores de Ph, o sistema enzimático do fungo tem maior potência quando o Ph é constante, consequentemente, aumentando a remoção de DQO.

A degradação do carbaril mostrada por ZHANG (2003) mostrou que a atividade da ação enzimática do *Aspergillus niger* PY168 é mais intensa na faixa de Ph entre 6 e 8 sendo 7,5 o melhor e quando não há uma variação nos valores de Ph.

## CONCLUSÃO

O tratamento biológico utilizando o micro-organismo *Aspergillus niger* AN400, mostrou-se eficiente na degradação da água sintética contendo o pesticida paraquat.

As remoções de DQO alcançaram 92%%, indicando a capacidade do fungo em utilizar o pesticida como fonte de carbono.

As remoções dos nutrientes nitrogenados também foram eficazes, havendo o consumo do nitrato completamente na maioria dos ciclos e consumo de amônia acima de 30% em vários ciclos estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. New York, 2005.
2. BAKHTIARI, M.R., FAEZI, M.G., FALLAHPOUR, M., NOOHI, A., MOAZAMI, N., AMIDI, Z. **Medium Optimization By Orthogonal Array Designs For Urease Production By Aspergillus Niger PTCC5011**. Process Biochemistry, v. 41, p. 547–551, 2006.
3. COLBORN, T., DUMANOSKI, D., MYERS, J. P.; **O Futuro Roubado**, L & PM Ed.: Porto Alegre, 1997.
4. DIEZ, M.C. **Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants**. Journal Soil Science Plant Nutr, v.10, p.244–267, 2010.
5. GARCIA, I.G., PEÑA, P.R.J., VENCESLADA, J.L.B., MARTIN, A.M., MATIN, M.A.S., GOMES, E.R. **Removal of phenol compounds from olive Mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum***. Process Biochemistry, v.35, p.751–758, 2000.
6. GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2.ed. New York, Wiley-Liss, 1994. 458p.
7. HERNÁNDEZ, M.S., RODRÍGUEZ, M.R., GUERRA, N.P., ROSÈS, R.P., **Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries**. Journal of Food Engineering, v. 73, n. 1, p. 93–100, 2006.
8. LEITE, C. L. *et al.* **A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares**. Biotemas, v. 19, n. 2, p. 17–27, 2006.
9. LIU, S-S., SONG, X-Q., LIU, H-L., ZHANG, Y-H., ZHANG, J. **Combined photobacterium toxicity of herbicide mixtures containing one insecticide**. Environment International, v.34, p.773–781, 2009.
10. LOPES, M. S. S.; OLIVEIRA, P. C. C.; ANDRADE, M. V. F.; ARAÚJO, R. S.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. **Remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por uso de reator aeróbio em batelada com inóculo fúngico**. Rev. Eng Sanit Ambient, v.16, n.1, p. 17–26, jan/mar, 2011.

11. PINO, N., PEÑUELLA, G. **Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and clorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site.** Int Biodeterior Biodegradation, v.65, p.827-883, 2011.
12. SAMPAIO, G.M.M.S., SANTAELLA, S.T. **Remoção de DQO em água residuária industrial através de um sistema em escala laboratorial composto por um reator uasb seguido por um filtro biológico com fungos.** In: VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2002. Vitoria. **Anais...** Vitoria: ABES 2002.
13. SANGTIEAN, T., SCHIMIDT, S. **Growth of subtropical EMC fungi with different nitrogen sources using a new flotation culture technique.** Mycol. RES, v. 106, n. 1, p. 75-85, 2002.
14. SOUZA, D., MACHADO, A. S. **Estudo Eletroanalítico Do Herbicida Paraquat Em Soluções Aquosas Por Voltametria De Onda Quadrada Utilizando Ultramicroeletrodos.** Quim. Nova, Vol. 26, No. 5, 644-647, 2003.
15. ZHANG. Q., LIU. Y., LIU, Y.H., **Purification and characterization of a novel carbaryl hydrolase from Aspergillus niger PY168.** FEMS Microbiol Lett ,v.228,p.39–44,2003.