



## I-228 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE ATRAZINA EM REATORES EM BATELADA AERADA POR *Aspergillus niger* AN400

**Raquel Marinho Cunha Martins<sup>(1)</sup>**

Graduanda em Engenharia Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE.

**Gleyciane Nobre Rocha**

Graduanda em Engenharia Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE.

**Kelly de Araújo Rodrigues**

Engenheira Civil, Doutora Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP, prof<sup>a</sup>. da Área de Química e Meio Ambiente – IFCE

**Germana Maria Marinho Silva**

Farmacêutica, Profa. da Área de Química e Meio Ambiente – IFCE

**Glória Maria Marinho Silva Sampaio**

Farmacêutica - Bioquímica, Doutora Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP, prof<sup>a</sup>. da Área de Química e Meio Ambiente – IFCE

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Avenida Contorno Norte, 1800 Bloco B apt° 302 - Conjunto Esperança - Fortaleza - Ceará - CEP: 60763-730 - Brasil - Tel: (85) 3487.2068 - e-mail: [raquelmarinho@ifce.edu.br](mailto:raquelmarinho@ifce.edu.br)

### RESUMO

A agricultura utiliza vários compostos químicos com o objetivo de funcionarem como pesticidas. A atrazina, um pesticida utilizado no controle de ervas daninha, principalmente em culturas de milho, é um contaminante potencial em virtude de suas características: elevada persistências em solos, solubilidade baixa em água, adsorção a matéria orgânica. Neste estudo avaliou a biodegradação de atrazina em reatores em batelada aerada, com inóculo de *Aspergillus niger* AN400, sendo realizado em quatro etapas: cultivo e produção dos esporos de *Aspergillus niger* AN400, imobilização da biomassa, montagem e operação dos reatores. Os reatores foram divididos em três lotes: reatores de controle (RC), reatores com fungos (RF), reatores com fungo e glicose (RFG). O experimento foi conduzido em cinco dias. As variáveis analisadas foram: potencial hidrogeniônico, demanda química de oxigênio, nitrito, nitrato, amônia e concentração de atrazina. Foi verificada uma remoção de 60% de atrazina nos reatores com fungo, no 3º dia reacional, demonstrando a potencialidade do uso de reatores com fungos no tratamento de águas contaminadas com atrazina.

**PALAVRAS-CHAVE:** reatores em batelada, atrazina, *Aspergillus niger* AN400, tratamento.

### INTRODUÇÃO

A atrazina é um herbicida importante, utilizado principalmente na cultura de milho. A literatura que trata da contaminação ambiental por este agrotóxico, principalmente nos EUA e Europa, é bastante ampla (Schiavon, 1988; Hall et al., 1972; Frank & Sirons, 1979; Buser, 1990). Sua distribuição pelo ecossistema se deve a processos de volatilização, lixiviação, escoamento superficial, reações químicas e, principalmente, à sua moderada, mas não curta, persistência no ambiente (Bintein & Devillers, 1996). É estudada sob os mais diferentes aspectos (Bintein & Devillers, 1996), podendo ser degradada via processos químicos e microbiológicos, originando produtos hidroxilados e desalquilados, respectivamente.

Atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) é um herbicida da classe dos triazínicos, utilizado no controle de ervas daninhas. Sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com Cl, etilamina e isopropilamina, a qual a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente (RITTER, 1990).

Sampaio (2005) constata que a biorremediação é uma tecnologia que utiliza o metabolismo de microrganismos para eliminação rápida de poluentes presentes no ambiente ou a sua redução a níveis de concentração aceitáveis. A biorremediação vem sendo desenvolvida com o objetivo de explorar a diversidade



genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (UETA, 2005).

Rodrigues et al. (2006) afirmou que os fungos atuam como decompositores primários na natureza, possuindo grande potencial na degradação dos mais diferentes tipos de poluentes. Característica importante desses microrganismos é a sua capacidade de suportarem variações de carga orgânica, pH e oxigênio, além de sua rápida reprodução e proliferação, que podem ser mencionados como indicadores de viabilidade em empregá-los em reatores biológicos para o tratamento de águas residuárias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### CULTIVO E PRODUÇÃO DOS ESPOROS DE *Aspergillus niger* AN400

Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram cultivados, em placas de Petri estéreis, no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do IFCE, contendo 15 mL de meio de cultura Sabouraud, meio específico para crescimento dos fungos, sendo uma mistura de peptonas, agar-ágar, 2% de dextrose e glicose, o qual foi previamente esterilizado a 122°C, durante, 15 minutos. Adicionou-se ainda às placas, solução de Vischiniac (solução de nutrientes), na concentração de 1 mL/L de meio de cultura, como fonte de nutrientes para os fungos (SAMPAIO, 2005).

Após a solidificação do meio de cultura, os esporos foram inoculados nas placas e estas foram mantidas sob temperatura de 28°C por 7 dias.

A remoção dos esporos foi realizada com solução Tween 80, e a suspensão de esporos formada foi removida com uso de pipeta automática, previamente esterilizada, e transferida para frasco de 200 mL, e mantida sob refrigeração.

A contagem dos esporos foi efetuada em microscópio óptico, com aumento de 40 vezes, retirando-se do frasco 50 µL da suspensão de esporos, a qual foi diluída em solução Tween 80, na diluição de 1:20. Em seguida foi removido 20 µL da suspensão de esporos e transferido para câmara de Neubauer para contagem.

### EFLUENTE SINTÉTICO

O efluente sintético foi preparada com água de torneira, acrescida de 1 mL/L de Vischiniac (solução de nutrientes), 0,05g/L de cloranfenicol (antibiótico) e atrazina na concentração de 15 mg/L.

### IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA

Foram usados 6 erlenmeyers de vidro, com volume total de 250 mL, os quais foram esterilizados juntamente com espuma de poliuretano utilizada como meio suporte em autoclave, durante 20 minutos a uma temperatura de 121°C.

Foram acrescidos 100 mL da solução de nutrientes cuja composição esta exposta na Tabela 1. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora com rotação de 150 rpm durante uma semana. Após três dias o meio nutritivo foi trocado para melhor crescimento do fungo.



Tabela 1: Solução de nutrientes

NUTRIENTES	QUANTIDADE	UNIDADE
SULFATO FÉRRICO	0,05	g/L
NITRATO DE SÓDIO	1	g/L
FOSFATO DIHIDROGENO DE POTÁSSIO	0,2	g/L
SULFATO DE MAGNÉSIO	0,25	g/L
CLORETO DE CÁLCIO DIHIDRATADO	0,01	g/L
SULFATO DE COBRE	0,08	g/L
SULFATO DE AMÔNIO HEPTAHIDRATADO	2	g/L
ÁCIDO MOLIBDÍDICO	0,05	g/L
SULFATO DE MANGANÊS PENTAHIDRATADO	0,05	g/L
SULFATO DE ZINCO	0,04	g/L
GLICOSE	2	g/L

## MONTAGEM DOS REATORES

Foram utilizados 6 reatores constituídos de frascos cilíndricos de vidro, com tampa rosqueável e com volume total de 2,5 L, e volume útil de 2,0 L, os quais foram previamente desinfetados com ácido clorídrico 3 M.

Os reatores foram divididos em três lotes: 2 de controle (RC), com apenas o efluente sintético; 2 com efluente sintético e fungos (RF) e 2 com efluente sintético, fungo e 0,5 g/L de glicose (RFG). O tempo reacional foi de cinco dias.

## VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis analisadas foram: DQO (demanda química de oxigênio), pH (potencial hidrogeniônico), nitrito, nitrato, amônia, de acordo com APHA (1998), exceto atrazina, cuja determinação foi realizada por cromatografia líquida (HPLC Gilson mod. 321, equipado com detector UV-VIS), coluna Varian Microsorb – MV 100-5 C18 250 x 4.6mm, sistema isocrático com fase móvel metanol/água (60:40 v/v),  $\lambda = 260$  nm, Q = 0.075 mL/min e volume de injeção de 50  $\mu$ L.

## RESULTADOS E DISCURSÕES

### POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Os valores de pH nos reatores de controle (RC) permaneceram entre 6 e 7, nos reatores com fungo (RF) variou entre 6 e 5 e nos reatores com fungo e glicose (RFG) a variação foi de 3 a 7, como mostrado na Figura 1.

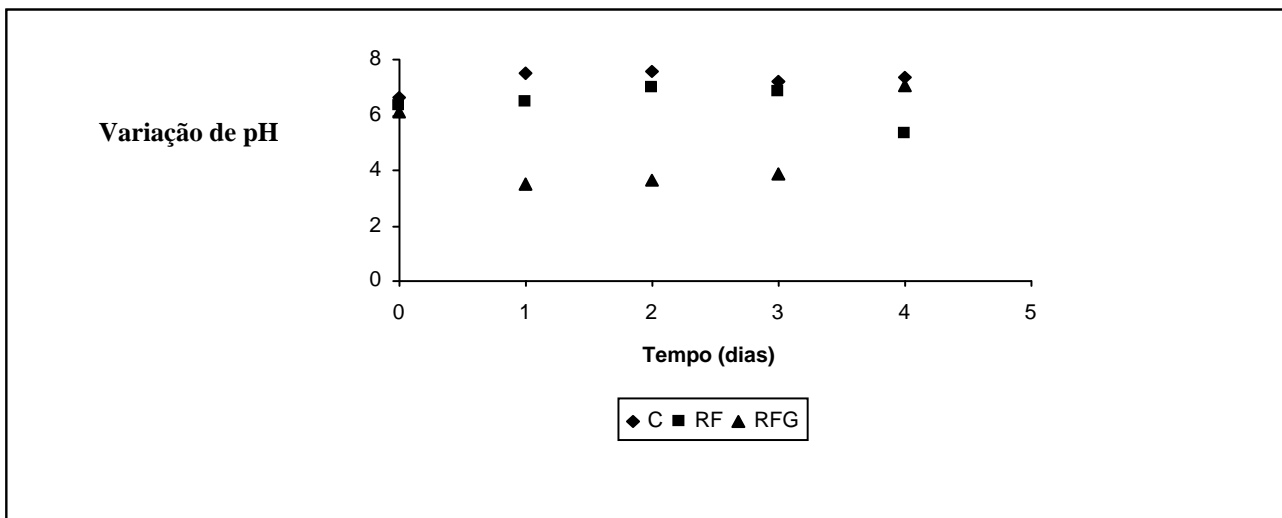
Nos reatores com fungo e glicose (RFG) evidenciou uma queda no pH como possível consequência de uma maior produção de ácidos orgânicos, oriundos da degradação de compostos presentes no efluente sintético, conforme relatado por Rodrigues (2006) e Fadil et al. (2003). Segundo esses autores a produção de ácidos orgânicos é reflexo da melhor atividade metabólica do *Aspergillus niger* AN400.

É importante ressaltar que o pH tem relação com a produção de biomassa fúngica no interior dos reatores (Rodrigues, 2006), sendo que O'Donnell et al. (2001), ao investigar o efeito do controle do pH sobre a



atividade de enzimas proteases produzidas por *A. niger* observou maior produção de biomassa em pH 3 (5,1 g de biomassa/L), registrando-se valores menores em pH 7 (1,9 g de biomassa/L).

**Figura 1: Variação do pH nos reatores em batelada aerada**



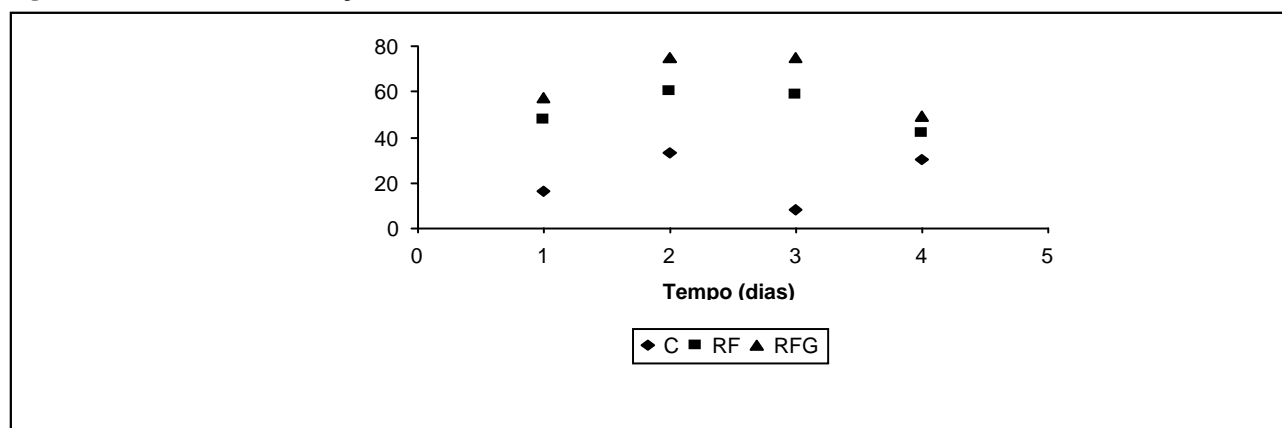
### DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

Houve remoção de DQO tanto nos reatores controle como nos reatores com fungos. Nos RF foram obtidas remoções de 60% no 2º dia e 59% no 3º dia reacional. Em RFG houve 75% de remoção nos tempos 2 e 3 (dias).

Segundo Wanderley (2007) a instabilidade na remoção de matéria orgânica pode estar relacionada com a presença de subprodutos formados no meio, ou mesmo substâncias excretadas pelos fungos oriundas do seu metabolismo.

Rodrigues (2006) diz que a glicose por ser um composto mais facilmente degradado, resulta em um aumento mais rápido da biomassa, e, conseqüentemente, da eficiência de remoção de matéria orgânica, devido seu maior consumo pela população microbiana.

**Figura 2: Percentual de remoção de DQO nos reatores em batelada aerada**

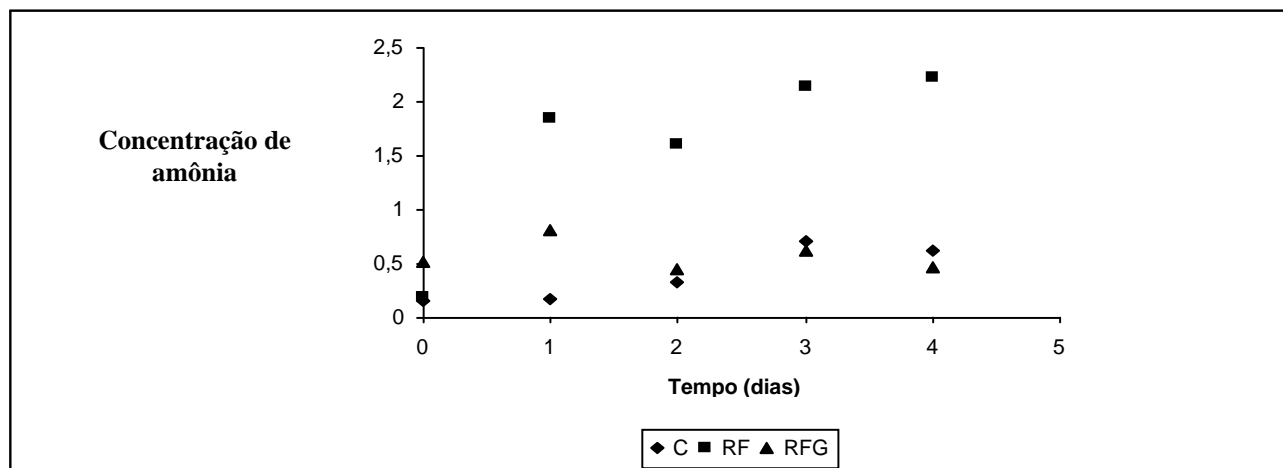




## AMÔNIA

Nesta pesquisa foi verificada síntese e oscilações de amônia nos reatores com fungo (RF), como mostra a Figura 3.

**Figura 3: Concentração de amônia**



Sá (1997) tratou água residuária de indústria de laticínios utilizando as espécies fúngicas *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Drechslera* sp. Observou variações em relação à remoção de amônia em seu experimento, com aumento da concentração deste no efluente. Segundo a autora, as oscilações dos valores de amônia podem ter sido geradas por mudanças fisiológicas dos fungos ou por estabelecimento de novas populações microbianas.

A instabilidade alcançada nesta pesquisa ocorreu em outros trabalhos com o emprego de fungos, como nos trabalhos de Santos et al. (2006) e Sampaio et al. (2004), em que os autores estudaram a biodegradação de efluente de indústria de beneficiamento de castanha de caju e obtiveram como resultados uma alternância em momentos de remoção e de produção deste composto ao longo de seus experimentos.

## ATRAZINA

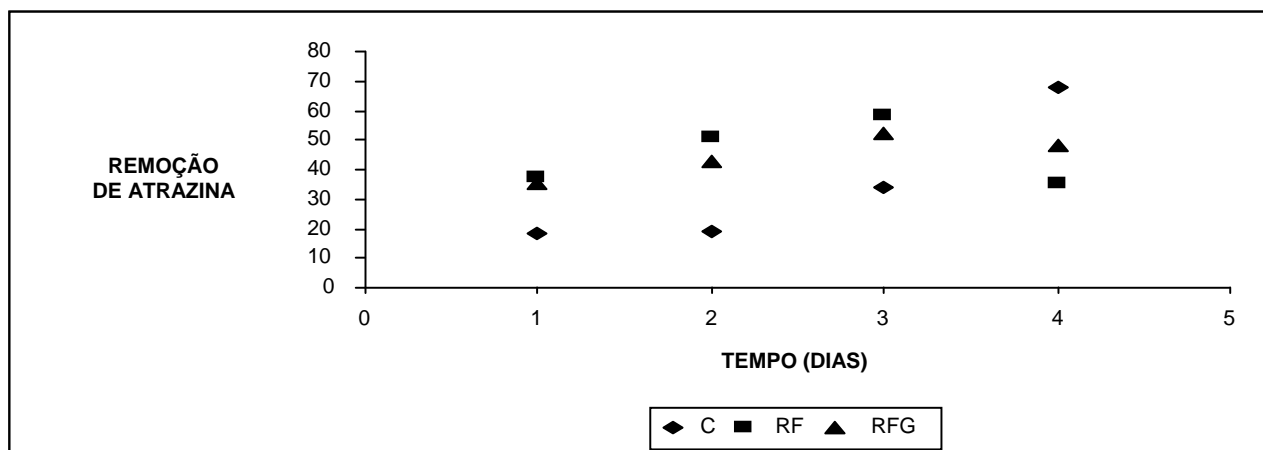
Os resultados mostraram que no final do experimento a remoção de atrazina foi de 58% nos reatores com fungo (RF), e nos reatores com fungo e glicose (RFG) a remoção foi de 55% no 3º dia operacional, como mostrado na Figura 4.

Gu et al. (2003) empregando três tipos de solos, sob condições metanogênicas, verificou remoção de atrazina, inicialmente com 150 dias de incubação e, após 300 dias, ainda restava 30% da concentração inicial. Nesta pesquisa, houve 58% de remoção de atrazina nos reatores com fungo (RF) no 3º dia de operação, tempo este bastante inferior quando comparado com o da pesquisa de Gu et al. (2003).

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, sendo que os percentuais de remoção foram muito próximos aos percentuais encontrados nos reatores sem glicose. Diferentemente, de Ghosh e Philip (2004) que estudaram a degradação da atrazina em condições anaeróbicas verificaram que a presença de um co-metabólico(glicose) resultou em melhor mineralização do herbicida do que no reator que empregou atrazina como única fonte de C e N.



Figura 4: Remoção de atrazina



## CONCLUSÕES

A comunidade microbiológica formada, na fase do experimento, em batelada utilizando micélio fúngico, com predomínio da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 nos reatores RF e RFG, mostrou-se viável ao tratamento biológico com fungos para remoção de atrazina.

No experimento, a presença do substrato primário (glicose) não teve influência na remoção de atrazina, ficando os percentuais de remoção muito próximos aos percentuais encontrados nos reatores sem a glicose.

A pesquisa demonstrou a potencialidade do uso de reatores com fungos no tratamento de águas contaminadas com atrazina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA – AWWA – WEF Standard methods for the examination of water and wastewater 19th, Washington DC, USA, 1999.
2. BINTEIN, S.; DEVILLERS, J. Evaluating the environmental fate of atrazine in France. Chemosphere, Oxford, v.32, n.12, p.2441-2456, 1996.
3. BUSER, H.R. Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland. Environmental Science & Technology, Washington, v. 24, p.1049-1058, 1990.
4. FADIL, K., CHAHLAOU, A., OUAHBI, A., ZAID, A., BORJA, R. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. International Biodeterioration & Biodegradation. 51:1: 37 – 41, 2003.
5. FRANK, R.; SIRON, G.J. Atrazine: its use in corn production and its loss to stream waters in Southern Ontario, 1975-1977. Science of the Total Environment, Amsterdam, v.12, p.223-239, 1979.
6. GHOSH, P. K.; PHILIP, L. (2004). Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. Water Research, v. 38, pp. 2277-2284.
7. GU, J.G.; FAN, Y.; GU, F.D. (2003). Biodegradability of atrazine, cyanazine e dicamba under methanogenic condition in three soils of China. Chemosphere, v. 52, pp. 1515-1521.
8. HALL, J.K.; PAWLUS, M.; HIGGINS, E.R. Losses of atrazine in runoff water and soil sediment. Journal of Environmental Quality, Madison, n.1, p.172-176, 1972.
9. O'DONNELL, D., WANG, L., XU, J., RIDGWAY, D., GU, T., MOO-YOUNG, M. Enhanced heterologous protein in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. Biochemical Engineering Journal. 8: 187 – 193, 2001.
10. RITTER, W. F. (1990). Pesticide contamination of ground water in the United States. Journal Environ. Sci. Health v. 15 pp. 1-29.
11. 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.



12. SÁ, I.M.B. (1997). Biotratamento de efluente de uma indústria de laticínios por ação de fungos decompositores. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 83p.
13. SAMPAIO, G. M. M. S. Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos. Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo – SP 2005.
14. SANTOS, F. F.; REZENDE, M. O. DE O. (1999). Degradação acelerada do inseticida paration etílico utilizando radiação ultravioleta na presença de ácido húmico. Anais Associação Brasileira de Química, v. 48, pp. 86-91.
15. SCHIAVON, M. Studies of the leaching of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxiatrazine from soil using <sup>14</sup>C ring-labeled compounds under outdoor conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety, San Diego, v.15, p.46-54, 1988.
16. WANDERLEY, P. R. C. (2007). *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo de reatores em batelada para remoção do corante vermelho do congo em meio aquoso sintético. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará). Fortaleza.