

## 444 - REMOÇÃO BIOLÓGICA DE PARAQUAT POR CONSÓRCIO FÚNGICO

**Alyne Vasconcelos Cavalcante<sup>(1)</sup>**

Doutora em Ecologia e Recursos Naturais (Universidade Federal do Ceará)

**João Pedro de Lima Alves Barbosa<sup>(2)</sup>**

Graduando em Tecnologia em Gestão Ambiental (Instituto Federal do Ceará)

**Gloria Maria Marinho Silva<sup>(3)</sup>**

Doutora em Hidráulica e Saneamento (Escola de Engenharia de São Carlos – USP)

**Sara Maria Paula da Rocha Rodrigues<sup>(4)</sup>**

Mestranda em Tecnologia e Gestão Ambiental (Instituto Federal do Ceará)

**Kelly de Araujo Rodrigues Pessoa<sup>(5)</sup>**

Doutora em Hidráulica e Saneamento (Escola de Engenharia de São Carlos – USP)

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Mister Hull, s/n. Campus do Pici, Bloco 906 - Fortaleza - Ceará - CEP: 60455970- Brasil -  
Tel: +55 (85) 3366-9805 - Fax: +55 (xx) 3366-9806 - e-mail: [alyneifce@gmail.com](mailto:alyneifce@gmail.com)

### RESUMO

A agricultura é uma atividade humana geralmente associada à aplicação de pesticidas, produtos que asseguram a proteção contra perdas na produção ou destruição de culturas. Esta atividade dissemina diferentes substâncias químicas que atuam em um conjunto específico de pragas, mas que se tornam potencialmente danosas a outros organismos e ambientes. A biorremediação é um processo sustentável que retira ou diminui a presença de poluentes do meio ambiente e se utiliza de muitos microrganismos capazes de reduzirem sua toxicidade. Tais microrganismos podem compor consórcios microbianos responsáveis pela biorremediação de poluentes orgânicos diversos. Este trabalho consistiu no estudo de remoção do herbicida Paraquat na concentração 50 mg L<sup>-1</sup> em meio aquoso através de tratamento biológico que consistiu na aplicação de fungos de duas espécies distintas e, posteriormente, pela formação de consórcio entre elas. O objetivo foi de comparar as remoções de paraquat em meio aquoso que continham um cossustrato adicionado. A repicagem de fungos aconteceu em meio *Potato Dextrose Agar*, 39 g L<sup>-1</sup>. O cossustrato utilizado foi a glicose, para avaliação de como esta interferia na remoção do pesticida. Foram utilizados 60 reatores, sendo 30 na ausência de cossustrato e 30 com cossustrato e mais 20 que constituíram o grupo controle (10 sem cossustrato e 10 com cossustrato). O meio continha água de abastecimento, 50 mg.L<sup>-1</sup> de paraquat e nutrientes para metabolismo fúngico. As etapas consistiram em a) cultivo do inóculo de *A.niger*. e *P.chrysosporium*; b) preparação de reatores com biomassa dispersa dos fungos; c) análise dos parâmetros paraquat, pH e DQO nos tempos 1, 2, 3, 4 e 7 dias. Em relação ao herbicida, na ausência de glicose, a remoção em reatores com *A.niger* foi de 4,3% e 3,4% em reatores com *P.chrysosporium*. Estes valores se elevaram quando houve adição de glicose, alcançando remoção de 39,34% para *P.chrysosporium* e 36,48% para *A.niger*. Reatores com *A.niger* e glicose tiveram menor pH (média 5,3) e melhor remoção do pesticida. Reatores com *P.chrysosporium* e glicose atingiram média de pH 6 e também atingiram melhor remoção. Para reatores que continham ambos fungos a remoção foi de 42,2%, superior aos valores dos fungos separadamente. Em relação a DQO bruta, esta aumentou na maioria dos reatores como reflexo indireto do crescimento de biomassa, sendo a remoção nos reatores consórcio, observado na Fase II, de 144,28 mg L<sup>-1</sup> que reduziu para 71,1 mg L<sup>-1</sup> no fim de 7 dias. Foi possível concluir que há vantagem no uso consórcio, pois foi mais eficiente na ausência de glicose, portanto sem necessidade de adição de maiores custos a processos de tratamento deste tipo.

**PALAVRAS-CHAVE:** pesticida, degradação, reatores, glicose.

### INTRODUÇÃO

Grande parte dos processos que envolvem uso de agrotóxicos podem oferecer algum risco de contaminação ambiental e durante os últimos anos o uso de recursos biológicos para degradar ou remover pesticidas se estabeleceu como alternativa com potencial para minimizar impactos ambientais deste tipo (MAQBOOL et al. 2016). Pesticidas são compostos químicos empregados em várias práticas na agricultura como controle de pragas, ervas daninhas e doenças nas plantas, o que os tornou ferramenta vital para o aumento do rendimento



de culturas (SHARMA et al. 2019). Nas últimas décadas, uma das grandes questões ambientais em pauta são os impactos adversos causados pela aplicação de pesticida, pois o uso excessivo de fertilizantes químicos atinge diferentes matrizes incluindo solo, ar e água. Como consequência, além de contaminação do ambiente e organismos muitas vezes não-alvo desses componentes, a saúde humana também é afetada negativamente. No Brasil, o uso do paraquat foi reavaliado entre os anos de 2008 e 2017 devido sua alta toxicidade aguda e crônica, sendo que, em 2017, foi temporariamente banido, mas em face de pressão de produtores e associações de agricultores seu uso estocado e com várias restrições voltou a ser permitido na safra 2020-2021 até 31 de julho de 2021. Em comunidades microbianas naturais a capacidade de degradação de poluentes pode ser melhorada com a adição de cepas específicas, por isso bactérias e fungos têm ampla utilização em processos de biorremediação. Dentre eles, os fungos apresentam alta capacidade de biodegradar substâncias devido a sua forte tolerância em altas concentrações de poluentes (GONZÁLEZ et al., 2021). A vantagem de usar um consórcio microbiano pode ser atribuída a capacidades metabólicas mais amplas e ao efeito sinérgico entre os membros da cultura microbiana, levando ao aumento da eficiência de biodegradação (CHENG et al., 2017). Nesse sentido os consórcios apresentam maior potencial para degradação de pesticidas, pois a vida em consórcio contribui com a sobrevivência, e aumenta as vias catabólicas. Sendo assim este trabalho consistiu no estudo de remoção do herbicida Paraquat na concentração  $50 \text{ mg L}^{-1}$  em meio aquoso através de tratamento biológico que consistiu na aplicação de fungos de duas espécies distintas e, posteriormente, pela formação de consórcio entre elas.

## OBJETIVO

O objetivo foi verificar a capacidade das espécies fúngicas *Aspergillus niger* AN 400 e *Phanerochaete chrysosporium* em degradar o herbicida paraquat em meio aquoso e investigar a influência de cossustrato na melhora da remoção do pesticida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Microrganismos e condições de cultivo

As cepas utilizadas foram provenientes do Laboratório de Tecnologia Ambiental do Instituto Federal do Ceará (LATAM). A espécie *Aspergillus niger* AN 400 foi cultivada em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) e a espécie *Phanerochaete chrysosporium* com meio PDA modificado segundo as proporções ( $\text{g L}^{-1}$ ): PDA, 39 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6 g; extrato de levedura, 2,0 g; peptona, 2,0 g; glicose, 20 g e ágar, 15 g. O meio preparado foi previamente esterilizado em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Nessa etapa, placas esterilizadas receberam 11 mL do meio de cultura previamente autoclavado. Após a adição do meio, o mesmo foi deixado para solidificar e após resfriado foi introduzido o inóculo fúngico em forma de disco de micélio (*plug*). Após um bom crescimento das placas que ficaram mantidas em estufa bacteriológica a cerca de  $28^\circ\text{C}$  por período de sete dias, as placas foram mantidas sob refrigeração a cerca de  $4^\circ\text{C}$  para montagem dos reatores.

### Constituição de meio sintético

O meio sintético foi preparado a partir de água de torneira,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5), e 10% (v/v) de solução de Vishniac que possuía em sua composição:  $10 \text{ g L}^{-1}$  EDTA;  $4 \text{ g L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,32 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0,22 \text{ g L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,47 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (RODRIGUES, 2010). Em relação ao uso do pesticida optou-se pelo uso da concentração  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de paraquat.

### Montagem de reatores com biomassa dispersa

Nessa etapa foi preparada uma solução aquosa na qual foi empregada glicose como cossustrato para verificarmos a sua influência na biodegradação do paraquat em meio aquoso. Foram utilizados 70 reatores divididos em 10 controles e duas fases: Fase I – 30 reatores sem cossustrato e Fase II – 30 reatores com cossustrato. A montagem de reatores foi realizada em incubadora de bancada (shaker) com velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) e temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os reatores consistiram em erlenmeyers de 250 mL que receberam meio sintético com concentração  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de pesticida. Após preparação de água sintética adicionada de solução de Vishniac na proporção  $1 \text{ mL L}^{-1}$ , foi medido o pH e temperatura do meio antes da distribuição nos reatores, sendo o dia de montagem considerado o dia zero (0 h) da batelada dispersa.

O tempo reacional total empregado foi de sete dias, com tempos intermediários de 1, 2, 3 e 4 dias, tanto para os reatores com inóculo de fungos isolados como para fungos em consórcios. Os 10 reatores de controle, sem adição de inóculo fúngico, tinham objetivo de verificar uma possível degradação abiótica do pesticida. A

glicose empregada como cossustrato foi adicionada na proporção de 5 g L<sup>-1</sup> em todos reatores da Fase II. Por fim os reatores foram fechados com papel alumínio e TNT para evitar fotodegradação do meio conforme representados na Figura 1.



**Figura 1: reatores montados em mesa agitadora a 150 rotações por minuto (rpm).**

As análises realizadas e respectivos métodos estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1: Variáveis monitoradas e método utilizado.**

Variável	Método
DQO	APHA ( 2005)
pH	APHA ( 2005)
Atrazina	AOAC 969.09 (2000)
Lacase	Asemolloye et al (2020)
MnP	Anasonye et al (2015)

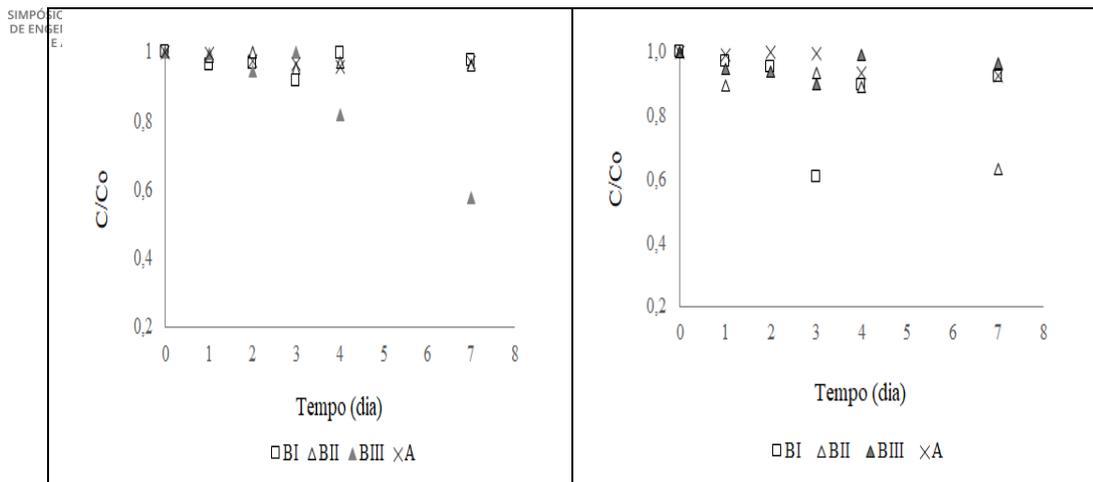
A determinação de paraquat seguiu o método AOAC 969.09 (2000) que se baseia na reação de ditonito de sódio 1% (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) diluído em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> com as amostras retiradas dos reatores. A análise consistiu em pesar 1 g de ditonito de sódio em balança analítica e diluir em balão de 100 mL com solução NaOH, do qual foram retirados 5 mL e acrescidos em balões de 50 mL que continham 2,5 mL de amostra de cada reator e, por fim, aferidos com água destilada sendo obtida uma coloração azul conforme Figura 2 . Após homogeneização lenta dos balões as leituras foram feitas em espectrofotômetro em comprimento de onda 600 nm.



**Figura 2: Diluições para curva de determinação de paraquat.**

## RESULTADOS

Na Fase I, sem adição de glicose como cossustrato, para os reatores com inóculo isolado de *Aspergillus niger* AN 400 e *Phanerochaete chrysosporium* não houve remoção de pesticida. Nos reatores com *A. niger* AN 400, apenas no terceiro dia dentre os sete dias de tempo reacional, a partir da concentração inicial de 50 mg L<sup>-1</sup>, foi registrada 8,48 ± 0,5% de remoção, sendo ainda menor o percentual registrado para *P. chrysosporium*, de 4,54 ± 2%, também no terceiro dia. Ainda em relação ao emprego de inóculo isolado, na Fase II, com adição de 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, foi observada uma remoção de 36,48 ± 0,5 % de paraquat ao final do tempo reacional de 7 dias, também para a concentração inicial de 50 g L<sup>-1</sup> por *P. chrysosporium*. Nos reatores que receberam inóculo de *A. niger* AN 400 e adição de glicose, a remoção de paraquat foi superior à de 4,3% ± 1, obtido na ausência da glicose, e passou para 39,34 ± 1%, percentual este registrado no terceiro dia da batelada (Figura 3).



**Figura 3: Remoção de paraquat ao longo da batelada com biomassa dispersa, Fases I (a) e II (b), com BI (*Aspergillus niger*, BII (*P. chrysosporium*), BIII (*Aspergillus niger* + *P. chrysosporium*)**

Considerando a ação individual, na forma de inóculo isolado aplicado aos reatores, as maiores eficiências foram exibidas pelos fungos *A. niger* AN 400 e *P. chrysosporium* na presença de glicose, como mencionando anteriormente, respectivamente, o que indicaria que a maior disponibilidade de carbono de fácil assimilação auxilia os fungos na maior tolerância ao pesticida, o que segundo Griffin (1994) estaria relacionado ao fato de que durante o uso da fonte primária de carbono serem gerados compostos secundários que desempenham papel importante na ativação do sistema enzimático, com a remoção do paraquat ocorrendo por co-metabolização. Nos reatores de controle não foi observada variação relevante da concentração do paraquat, tanto nos reatores de controle com glicose quanto nos que não a receberam. Nesses reatores, no último dia de batelada, foram registradas remoções de paraquat de apenas  $7,3 \pm 0,4\%$  e  $4 \pm 0,5\%$ , respectivamente, nos reatores de controle com e sem adição de glicose ao meio. O pH nos reatores de controle com e sem glicose chegou, respectivamente, a  $6,0 \pm 0,2$  e  $6,8 \pm 0,3$  e no último dia de batelada, sendo o pH inicial de  $7,05 \pm 0,3$ . Em relação ao pH, nos reatores com *A. niger* AN 400 em que foi adicionada a glicose, houve grande diminuição do pH, principalmente no último dia, chegando a 2,5. Nestes reatores o valor médio do pH ao longo do tempo de operação foi  $5,3 \pm 0,3$ . Já na ausência da glicose, os reatores com *A. niger* AN 400 mantiveram um valor médio de pH de  $7,8 \pm 0,6$ . Justamente, nos reatores com *A. niger* AN 400 e glicose, onde o valor do pH foi menor, com meio mais acidificado, ocorreu melhor remoção do paraquat. Para o *P. chrysosporium*, nos reatores nos quais não foi adicionada a glicose, o valor médio de pH foi de  $7,6 \pm 0,5$ , enquanto que nos que continham glicose, o pH médio foi de 6, de modo que para esta espécie a adição da glicose resultou na obtenção de uma remoção do pesticida quase oito vezes maior que a registrada quando da sua ausência, cujos valores de remoção foram de  $36,48 \pm 0,5\%$  e  $4,54 \pm 2\%$ , respectivamente. Ao se verificar a ação dos fungos consorciados, o melhor resultado obtido foi na Fase I, na ausência de cosubstrato. O ensaio com os reatores em batelada e biomassa dispersa confirmou que houve variação no comportamento das espécies de fungos no que diz respeito à sua tolerância e potencial de degradação na presença e ausência da glicose, em função de estarem ou não consorciadas. O sinergismo fungo-fungo do consórcio *A. niger* AN 400 e *P. chrysosporium*, na ausência de glicose foi melhor que quando os fungos estiveram em contato com paraquat de forma isolada, pois resultou em  $42\% \pm 4$  de remoção, frente aos  $39,34 \pm 1\%$  de *A. niger* AN 400 e  $36,48 \pm 0,7\%$  de *P. chrysosporium*, ambos com presença de glicose. Em relação à matéria orgânica total, em termos de DQO, na Figura 4 é mostrada sua variação ao longo do tempo nos reatores. Na Fase I, os fungos isolados não removeram matéria orgânica, chegando ao aumento do valor da DQO, com efluente final com flutuações que alcançaram entre  $71,1 \text{ mg L}^{-1}$  a  $107,7 \text{ mg L}^{-1}$  no final da batelada (7 dias). Quando foram consorciados, os fungos alcançaram diminuição da demanda química de oxigênio, na ausência de glicose, de  $144,28 \text{ mg L}^{-1}$  para  $71,1 \text{ mg L}^{-1}$  no final do tempo reacional. Este consórcio foi o que melhor degradou o paraquat, com remoção de 42% na ausência da glicose. Quanto à Fase II, fungos isolados não apresentaram remoção, sendo *P. chrysosporium* saindo de  $5385,3 \text{ mg L}^{-1}$  de DQO inicial para  $7213,9 \text{ mg L}^{-1}$  no último dia da batelada e *A. niger* AN 400 de  $2460 \text{ mg L}^{-1}$  para  $5385,3 \text{ mg L}^{-1}$ .

O aumento nos valores de DQO, tanto nos reatores com e sem glicose refletem o crescimento de biomassa, uma vez que é possível observar valores maiores que o inicial, com um pico no 4º dia para *Aspergillus niger* AN 400.

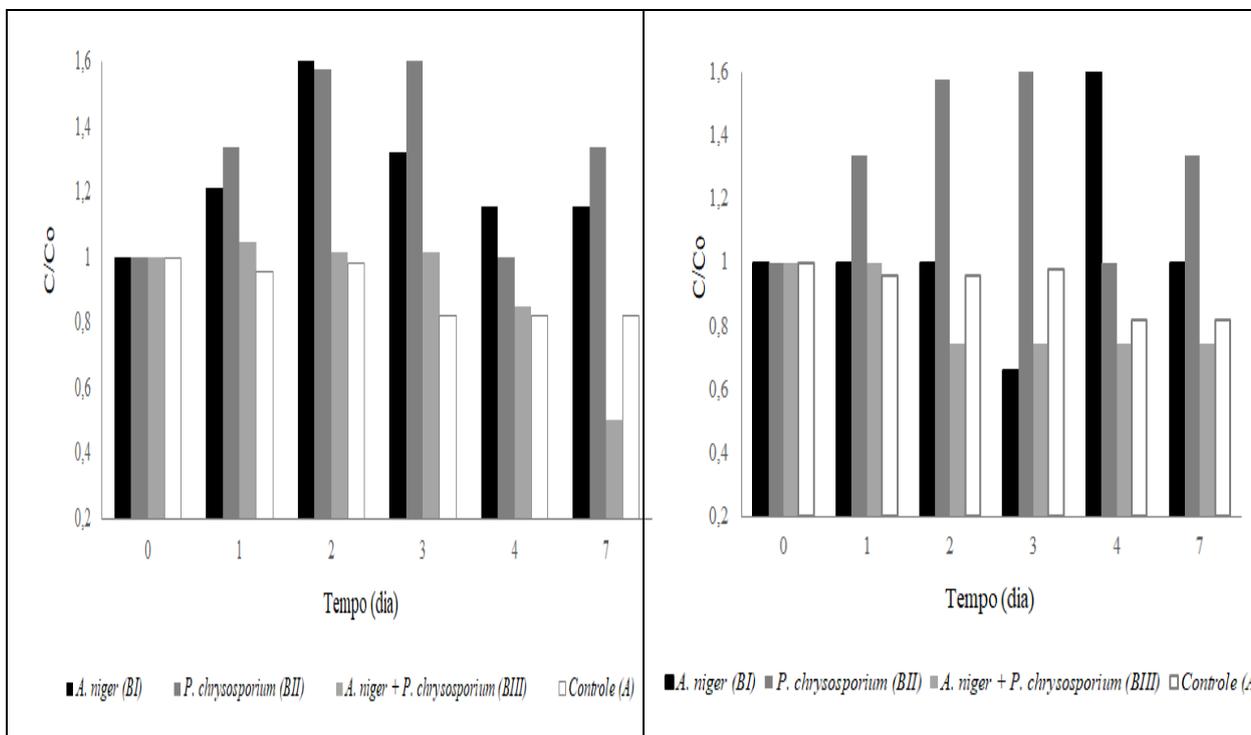


Figura 4: Remoção de DQO na batelada com biomassa dispersa a) Fase I (sem glicose) e b) com glicose ( $5 \text{ g.L}^{-1}$  glicose).

## CONCLUSÕES

Os dados do ensaio em batelada com biomassa dispersa indicaram que a remoção do paraquat do meio pelos fungos foi favorecida pela adição de glicose ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) nos reatores com inóculo isolado, destacando-se a espécie *Aspergillus niger* AN 400 que obteve a maior eficiência de remoção do meio, de 39,34%, seguida de *Phanerochaete chrysosporium*, com 36,48%. Porém, a aplicação dos fungos de forma consorciada dispensou a adição de glicose, sendo que foi possível a obtenção de maior eficiência de remoção do paraquat (42,2%) nos reatores que continham inóculo do consórcio *Aspergillus niger* AN 400 + *Phanerochaete chrysosporium*, o que demonstra sua grande viabilidade no processo de biorremediação do paraquat, uma vez que não requer a adição de co substrato. Apesar da espécie

*P. chrysosporium* aparentemente foi menos eficiente em termos de remoção do poluente que *A. niger* AN 400, de forma não consorciada, porém ambas espécies podem ser promissoras ao serem consorciadas, sendo que há uma necessidade de buscar estratégias alternativas que visem maior remoção do herbicida paraquat.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official Methods 969.09: *Paraquat in pesticide formulations (spectrophotometric method), official methods of analysis of AOAC International*. 17ª ed. Arlington, USA, 2000.
2. ANASONYE, F.; Winquist, E.; Rasanen, M.; Kontro, J.; Bjorklof, K., Vasilyeva, G.; Jorsensen, K. S.; Steffen, K. T.; Tuomela, M. Biorremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 105:7-12, 2015.
3. APHA- ASSOCIATIO, AMERICAN PUBLIC HEALTH. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington: American Health Association, 2005.
4. CHENG, Z.; LI, C.; KENNES, C.; YE, J.; CHEN, D.; ZHANG, S.; CHEN, J.; YU, J. *Improved biodegradation potential of chlorobenzene by a mixed fungal-bacterial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 123, p. 276-285, 2017.
5. GONZÁLEZ, C.; WU, Y.; ZULETA-CORREA, A.; JARAMILLO, G.; VASCO-CORREA, J. *Biomass to value-added products using microbial consortia with white-rot fungi. Bioresource Technology Reports*, v.



SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO  
DE ENGENHARIA SANITÁRIA  
E AMBIENTAL  
16, 2021

6. GRIFFIN, D. H. *Fungal physiology*. 2 nd ed. 458 p. Wiley-Liss, New York, 1994.
7. MAQBOOL, Z.; HUSSAIN, S.; IMRAN, M.; MAHMOOD, F.; SHAHZAD, T.; AHMED, Z.; AZEEM,



- F.; MUZAMMIL, S. *Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: A critical review. Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n.17, p. 16904–16925, 2016.
8. OLIVEIRA, R.; SILVA, S. Manual de análises físico-químicas de águas de abastecimento e residuárias. 70 p. DEC/CCT/UFPB, Campina Grande, 2001.
  9. RODRIGUES, K. 2010. *Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração em Hidráulica e Saneamento)* – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
  10. SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G.P.S.; HANDA, N.; KOHLI, S.K.; YADAV, P.; BALI, A.S.; PARIHAR, R.D.; DAR, O.I.; SINGH, K.; JASROTIA, S.; BAKSHI, P.; RAMAKRISHNAN, M.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; THUKRA, A. K. *Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences*, v. 1, n. 11, p. 1–16, 2019.