

I-261 - BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp***Libertalamar Bilhalva Saraiva⁽¹⁾**

Graduada em Eng. Química na FURG (1980), Mestrado em Engenharia de Alimentos, FURG (2000). Doutorado em Eng. Química, UFRN (2007), Professora de Tecnologia em Tratamentos de Resíduos, Estudo das Águas Industriais e Operações Unitárias no IFAM, AM.

Sônia Maria de Melo Lima⁽²⁾

Graduada em Ciências - Universidade Federal de Juiz de Fora (1975) com Habilitação em Biologia; Mestrado em Desenvolvimento Regional - Universidade Federal do Amazonas (2004). Doutoranda em Biotecnologia da UFAM. Professora de Biologia e Microbiologia no IFAM.

Ana Paula Miléo Guerra Carvalho⁽³⁾

Graduanda nos cursos de Tecnologia em Alimentos – IFAM e Farmácia e Bioquímica - UNIP.

Erickson Oliveira dos Santos⁽⁴⁾

Graduando em Tecnologia dos Processos Químicos – IFAM.

Endereço⁽¹⁾: Av. 7 de setembro, 1975 - Centro - Manaus - Amazonas Cep: 69020-120, Tel: (92) **Telefone:** (092) 3621-6793. liberta.saraival@ifam.edu.br

RESUMO

O trabalho foi desenvolvido em fases experimentais. Na primeira fase o experimento foi realizado com o fungo *Aspergillus sp*, em leito fixo, com glicose como fonte de carbono. Na segunda fase a fonte de carbono indutor na degradação biológica de fenol por fungo foi substituída de glicose para resíduo do processamento do cupuaçu. Foram estudadas duas espécies fúngicas: o *Aspergillus sp* e o *Trichoderma sp*. Nesta fase, a pesquisa foi realizada em duas etapas: na primeira, os dois fungos foram isolados e cultivados em meio Agar Batata por sete dias e inoculados nos reatores de bancada erlenmeyer (RB). Foram avaliados separadamente para verificar a sua eficiência na degradação de compostos fenólicos. Os experimentos foram desenvolvidos em RB com inoculação de 1,0 mL de suspensão fúngica, contendo 250 mL do efluente sintético em cada reator e 50 (mg/L) em DQO de resíduos de cupuaçu com diferentes concentrações de fenol. O desenvolvimento dos fungos e a remoção de matéria orgânica foram avaliados pelo parâmetro DQO durante 28 dias com intervalos de 07 dias. Os resultados obtidos mostraram que a eficiência do *Aspergillus sp*, é superior a eficiência a do *Trichoderma sp*. Na segunda etapa foram inoculados os dois fungos juntos no reator sequencial em batelada de leito submerso para verificar o possível sinergismo entre os dois microrganismos. Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o *Trichoderma sp* não inibe o *Aspergillus sp*, e há um sinergismo, o que leva a um tempo menor de reação com a mesma eficiência, proporcionando aumentos na quantidade de fenol degradado.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade fúngica, resíduo de cupuaçu, remoção de fenol.

INTRODUÇÃO

Os compostos aromáticos apresentam características recalcitrantes e são altamente tóxicos e acumulam-se nos corpos de água receptores e causam aumento da demanda de oxigênio. A problemática do descarte é decorrente do fato de que muitos desses poluentes se encontram dissolvidos no efluente e, portanto, não podem ser removidos por processos físicos convencionais. Estes compostos são encontrados em diferentes concentrações em diversos tipos de águas residuárias de indústrias, tais como, as de azeite de oliva, química, farmacêutica, corantes, pesticidas, solventes, destilarias de vinhos, de resinas, de papel e outros (ALBUQUERQUE, 2000).

Os fungos representam uma alternativa no tratamento de efluentes que possuem compostos aromáticos recalcitrantes, pois conseguem quebrar a cadeia fenólica, induzidos por uma fonte primária de carbono. São seres aclorofilados que necessitam de substâncias orgânicas que não conseguem sintetizar, absorvendo-as do meio através da produção de enzimas extracelulares que hidrolisam grandes moléculas, que se tornam assimiláveis por mecanismos de transporte, (TRABULSI, 2002; RODRIGUES, 2004).

Várias espécies de *Aspergillus* têm demonstrado eficiência na degradação dos fenóis, porém as atividades dos microrganismos podem necessitar serem induzidas com uma fonte de carbono como a glicose ou outros açúcares, como resíduos de frutas.

O trabalho propôs estudar a degradação de compostos fenólicos pelos fungos *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp* verificando primeiramente a potencialidade de cada um e posteriormente a eficiência de remoção com os dois microrganismos em reator sequencial em batelada, com resíduo de cupuaçu como fonte primária de carbono.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em duas fases experimentais:

PRIMEIRA FASE EXPERIMENTAL

O experimento foi desenvolvido em reator de bancada sequencial em batelada, de leito fixo confeccionado em acrílico com 100 mm de diâmetro, 500 mm de altura, 03 mm de espessura e volume útil de 3,5 L. O sistema constituiu-se de reservatórios para o afluente e o efluente, válvula de saída de água (tipo lavadora), mangueiras. O leito fixo do reator foi expandido utilizando-se uma haste de inox que suportam dois círculos de acrílico para separar o enchimento do reator e melhorar a fixação dos microrganismos. O reator foi revestido com papel madeira para proteger da luz e evitar a fotodegradação do fenol. Teve-se esse mesmo cuidado com o reservatório do afluente, reservatório de cor azul (Figura 1).

O controlador de processo “MENABARRETO” possibilita a variação do tempo de retenção e automatização do processo, com objetivo de evitar contaminação e permite determinar o tempo para cada função: encher, aerar, pausa e esvaziar (Figura 2).



Figura 1 – Sistema reacional e detalhes do leito fixo, controle de processo e bombeamento do afluente.

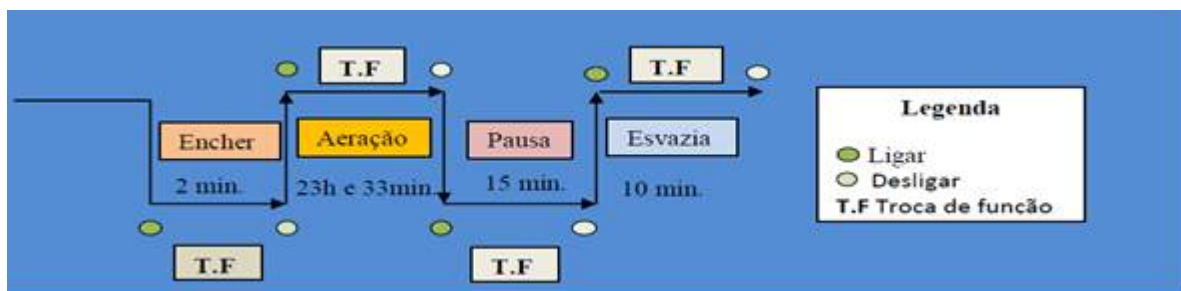


Figura 2 - Ciclo do reator de leito submerso com tempo de retenção hidráulica de 24 horas

A aeração do sistema foi feita utilizando um compressor tipo aquário e o oxigênio dissolvido (OD) medido com oxímetro digital e mantido em torno de 2 mg/L, com temperatura em torno de $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

A saída do afluente foi controlada por duas válvulas FESTO magnéticas de registro de passagem com controlador magnético com potência de 4,6 W e 24 V e com ddp de 28,4 V.

O reator foi alimentado com vazão de 2L/dia com bomba d'água, uma chave eletrônica junto a um mini pisquete para servir como boia e controlar o volume em aproximadamente 2 litros dentro do reator. O afluente foi bombeado para o reator por meio de bomba d'água controlado por controlador de fluxo.

Nesta fase, foi inoculado no reator o microrganismo *Aspergillus sp*, isolado de solo amazônico, cultivado em meio Agar Batata Dextrose (ABD), à temperatura de 28°C , durante 7 dias. Os conídios da linhagem de *Aspergillus sp* foram suspensos em água destilada esterilizada e as suspensões obtidas foram ajustadas na câmara de Neubauer a 4×10^6 esporos/mL. Foi utilizado efluente sintético (Silva et al, 2002) com glicose como fonte primária de carbono. Os tempos de retenção variaram de um a três dias. Durante o experimento apareceu no reator uma contaminação por um microrganismo que apresentava colônias esverdeadas que foi posteriormente identificado como o fungo *Trichoderma sp*.

RESULTADOS DA PRIMEIRA FASE

O sistema foi operado durante quatro meses, com 21 dias de aclimação do microrganismo ao resíduo. Pesquisas prévias em laboratório de microbiologia determinaram a concentração de 100 mg/L como inicial para avaliar o desempenho do fungo às condições de reação, com concentração de glicose de 50 mg/L e 25 mg/L como carbono indutor do mecanismo. Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Valores médios e variações da DQO afluente, efluente e da eficiência do sistema

TRH (dias)		3*	2	1
25 mg/L glicose Fenol (mg/L)		n=4	n=5	n=4
DQO a (mg/L)	Média	500,30	378,52	318,82
	DP	75,89	63,64	28,91
DQO e (mg/L)	Média	218,05	126,88	20,02
	DP	46,71	77,54	7,95
Eficiência (%)	Média	57,31	70,92	93,58

*No tempo de retenção de três dias foi utilizado uma concentração de 50 mg/L de glicose

Tabela 2 – Variação da DQO afluente e efluente com concentração de fenol de 200 mg/L

Fenol (200 mg/L) TRH – 01 dia	DQO a (mg/L)	DQO e (mg/L)	Eficiência (%)
Média	308,89	82,90	72,86
DP (n=7)	66,17	22,47	5,89

SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

Na segunda fase decidiu-se avaliar a influência do *Trichoderma sp* sobre a atividade do *Aspergillus sp*. Para isto optou-se por pesquisar ambos os fungos em duas etapas: na primeira estudá-los separadamente para avaliar a capacidade de cada um em degradar o fenol em ambiente estéril e na segunda etapa estudá-los juntos em reator sequencial em batelada de leito submerso para verificar o possível sinergismo na degradação de fenol. Foram utilizadas duas espécies fúngicas: o *Aspergillus sp*. (Figura 3) a partir da cepa disponível no acervo do IFAM, isolada a partir do solo amazônico e o *Trichoderma sp* que foi isolado a partir do material contido no reator utilizado na primeira fase da pesquisa (Figura 4).

Os dois fungos foram cultivados em meio Agar Batata Dextrose (ABD), à temperatura de 28°C, durante 7 dias, para então serem inoculados nos reatores. Os conídios da linhagem de *Aspergillus sp.*, e *Trichoderma sp* foram suspensos em água destilada esterilizada e as suspensões obtidas foram ajustadas na câmara de Neubauer a 4×10^6 esporos/mL.

Foram utilizados 30 erlenmeyes de 500 mL esterilizados sendo 15 experimentos com *Aspergillus sp* e 15 com o *Trichoderma sp.*, incubados à temperatura de $28^\circ \pm 2^\circ$ C por 7, 14, 21 e 28 dias, protegidos da luz para evitar a fotodegradação do fenol (Figura 5).

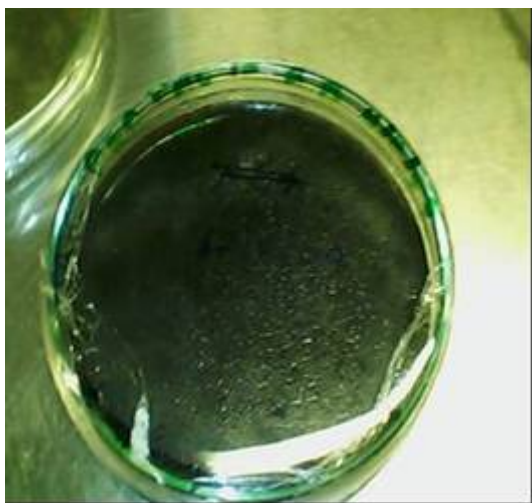


Figura 3 - *Aspergillus SP*



Figura 4 - *Trichoderma SP*



Figura 5 – Reator em batelada em ambiente estéril

Na segunda etapa a pesquisa foi realizada no reator de bancada em acrílico (Figura 1) em regime de batelada em leito submerso. A fonte de carbono indutor utilizada foi o resíduo do processamento do cupuaçu em substituição a glicose. Foram preparadas diferentes diluições em água destilada e a DQO de cada uma foi determinada. A partir dos resultados foram calculadas as quantidades necessárias para que obtivesse uma concentração de 50mg/L em DQO. A solução obtida foi esterilizada a 121 °C por 15 minutos para as amostras que foram utilizadas nos erlemeyers. No reator de acrílico o afluente não foi esterilizado.

O preparo do afluente sintético foi realizado nos Laboratórios de Controle Ambiental do IFAM, Campus Manaus Centro, com concentração baseada em Silva et al 2002, (NH₄Cl - 76,1 mg/L; Na₂HPO₄ 12 H₂O - 46,2 mg/L; NaCl - 10,1 mg/L; KCl - 4,7 mg/L; MgSO₄ · 7H₂O - 16,7 mg/L; NaHCO₃ - 162,2mg/L; Elementos (Fe₂Cl₃ · 6H₂O; ZnSO₄, MnSO₄ · H₂O 0,2mg/L) e fenol de 100 a 600mg/L com 50 mg DQO/L de resíduo do processamento do cupuaçu. Ao efluente foi adicionado clorofórmio 1% como agente bactericida. O pH do efluente foi ajustado com ácido clorídrico.

As concentrações de fenol foram aumentadas à medida que os microrganismos se adaptavam com a concentração anterior, monitorados pelo decréscimo de matéria orgânica dentro do reator. O tempo de retenção foi mantido em 24 horas, com aporte de oxigênio de 2mg/L e temperatura controlada em 28±2° C.

O processo foi monitorado pela análise de DQO do afluente e efluente. As análises executadas seguiram a metodologia estabelecida no Standard Methods of Water and Wastewater (APHA, 1998). Foram realizadas análises microbiológicas de controle para verificar a existência de contaminação do efluente à medida que eram aumentadas as concentrações de fenol.

RESULTADOS DA SEGUNDA FASE

Os resultados da primeira etapa da segunda fase experimental estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, onde se pode verificar que o *Aspergillus sp*, obteve uma eficiência superior ao *Trichoderma sp* na degradação do fenol. Valores similares para o *Aspergillus niger* foram encontrados por RODRIGUES, 2006.

Tabela 3 – Eficiências de remoção de DQO pelo *Trichoderma sp*

Fenol (mg/L)	Eficiência			
	07	14	21	28
TRH (dias)				
100	6,4	40,2	50,0	59,5
200	13,7	26,0	44,0	55,0

Tabela 4 - Eficiências de remoção de DQO pelo Fungo *Aspergillus sp*

Fenol (mg/L)	Eficiência			
	07	14	21	28
100	82	100*	100*	100*
200	69,6	93,4	100*	100*

* Considerado 100% de eficiência, pois o método não consegue detectar valores menores

Os resultados dos experimentos no reator de bancada em acrílico, ou segunda etapa, da segunda fase do experimento, estão apresentados na Figura 6. E, mostram a variação de DQO afluente e efluente durante o tempo de atividade do reator.

Depois da inoculação foram necessários seis dias para aclimação dos fungos ao substrato. O reator operou durante 44 dias com tempo de retenção hidráulica de um dia. Durante este tempo a concentração de fenol foi acrescida de 100mg/L para 600 mg/L. As eficiências baixas ao longo do experimento se devem a falta de energia e conseqüente diminuição no aporte de oxigênio dissolvido, além da elevação de temperatura da sala onde o reator se encontrava. Mesmo com estes contratempos pode-se verificar que as eficiências de remoção de DQO e conseqüente remoção de fenol foram significativas, como podem ser vistas na tabela 5 e na Figura 7.

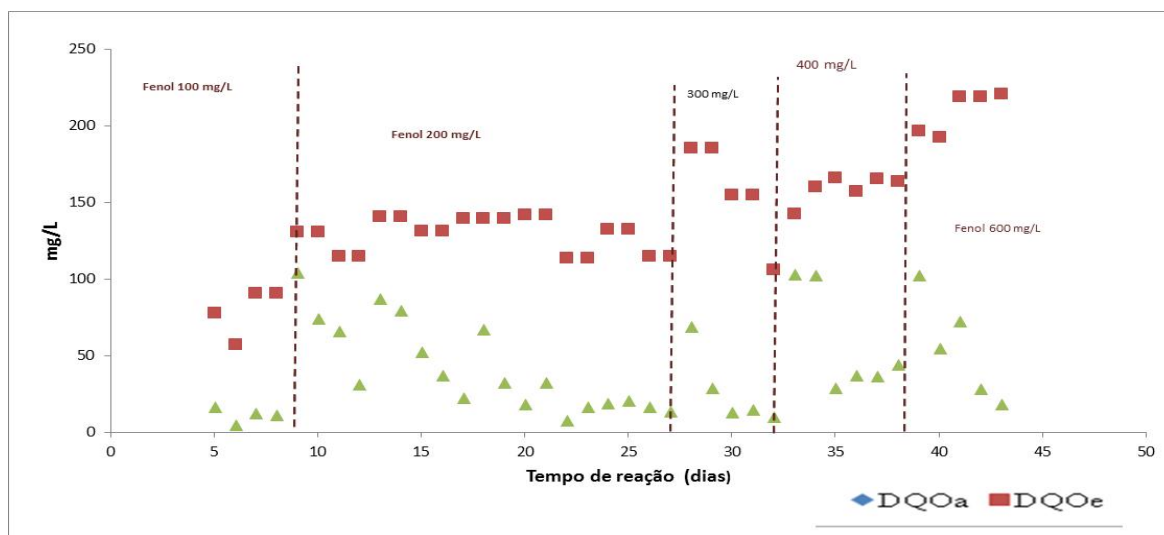


Figura 6 – Variação de DQO afluente e efluente durante o experimento no reator em batelada de leito submerso com os dois fungos (*Aspergillus sp*, *Trichoderma sp*)

Tabela 5 – Eficiências de degradação em relação ao acréscimo de fenol

Eficiência Média (%)	Fenol (mg/L)				
	100	200	300	400	600
	85	83	84	77	73

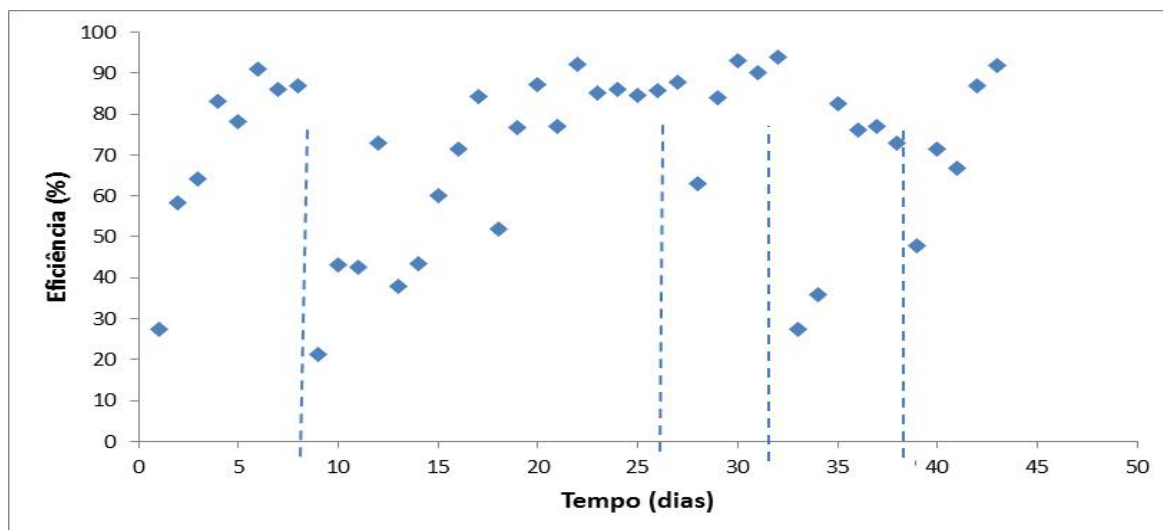


Figura 7 – Eficiência de remoção de DQO em função do tempo em cinco concentrações de fenol

Rigo et al (2006) estudaram a degradação de fenol por *Cândida parapsilopsis* em Reator contínuo (CSTR) pressurizado. O reator operou por 24 dias consecutivos e a entrada de afluente no reator apresentou concentrações de fenol na faixa de 300 a 900 mg/L, com remoção de 100% durante 16 dias consecutivos.

Passos (2006) obteve degradação total de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp* até uma concentração de 989 ± 15 mg/L, com diferentes velocidades de reação com 72 horas para degradar $320 \pm 0,57$ mg/L de fenol.

Silva et al (2007) isolaram as espécies *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp*, *Penicilium sp* e *Phoma sp* e verificaram que os níveis de degradação dos compostos fenólicos, expressos em mg de equivalente de ácido gálico, foram diferentes para cada um dos fungos avaliados, embora a maior degradação tenha ocorrido nos tempos de 24 e 48 horas de crescimento. Verificaram que a linhagem I-10 de *Penicilium sp* foi a que apresentou os melhores resultados, conseguindo degradar 478mg em 48 horas.

Neste trabalho, com os dois fungos em simbiose, o tempo de retenção hidráulico foi fixado em 24 horas e a remoção total medida em DQO chegou a 92% com 600 mg/L de fenol afluente e 50 mg DQO/L de resíduo de cupuaçu. Porém, observa-se também a partir do aumento na concentração de fenol que houve a redução média na eficiência da degradação, o que leva a inferir que o sistema começa a ficar mais instável, sendo ainda necessários estudos com concentrações superiores de fenol e maior tempo de análise. Além disto, a fonte de carbono deverá ser mais bem avaliada já que se trata de um resíduo e sua composição centesimal foi somente estimada.

Da primeira para a segunda fase do experimento no reator de bancada em acrílico houve substituição de leito fixo para submerso e foi possível observar o aumento da aeração e com isso a maior agitação do meio permitindo assim o crescimento dos fungos e o aumento da degradação dos compostos fenólicos, o que permite indicar o leito submerso. Porém, esta afirmação deverá ser confirmada em trabalhos posteriores.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos pode-se inferir que as espécies *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.* em simbiose apresentaram valores de remoção de carbono orgânico total como DQO significativos para valores de fenol afluentes de 600 mg/L. Observa-se também que o resíduo do processamento de cupuaçu pode ser utilizado como fonte primária de carbono, permitindo com isto tratar dois resíduos concomitantemente. Os resultados ainda permitem dizer que a remoção de compostos fenólicos é viável em reator em batelada com leito submerso, devendo ainda ser estudadas concentrações maiores de fenol, tempo de retenção hidráulica menores, variação do pH e variação da concentração da fonte de nitrogênio e fósforo, já que se trabalhou com um resíduo de processamento de fruta rica em nutrientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, A.F. Biodegradação de compostos fenólicos incorporados em areia de moldagem utilizando microrganismos do solo. Campinas: UNICAMP, 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil na área de concentração Saneamento), Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 2000.
2. APHA. Standard Methods of the Examination of water and wastewater, 20th edition. American Public Health Association. Woshington, DC. USA. 1998.
3. PASSOS, C. T. Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.* Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos- FURG – 2006.
4. RIGO, M.; COUTINHO, M.R.; ALVAREZ, D.C.; BEZERRA, J.R.M.V.; BRANCO, I.G.; MONTE ALEGRE, R. Biodegradação de Fenol por *Candida parapsilopsis* em Reator Contínuo (CSTR) Pressurizado. Revista Ciências Exatas e Naturais, Vol. 8 n o 2. 2006.
5. RODRIGUES, K. A., SAMPAIO, G. M. M. S., ZAIAT, M., SANTAELLA, S. T. (2004). Redução da concentração de fenol pelo uso de reatores biológicos com fungos, in: XI Simpósio Luso- Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – SILUBESA. Abril, 2004 (pp 58 – 59), Natal, RN.
6. RODRIGUES, K.A Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética. Tese de Doutorado - São Carlos, 2006.
7. SILVA, I. E. C.; LUDWIG, K.V.F.; NEUMANN, D.; SCHNEIDER, A. C.; ONOFRE, S. B. Fungos filamentosos degradadores de compostos fenólicos isolados de águas residuárias de postos de combustíveis. Revista de Biologia e Saúde da UNISEP: Biology & Health Journal – v.1, n.1, 2. 2007.
8. TRABULSI, L. R; ALTERTHUM. F; GOMTERTZ, O. S; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo. Editora Ateneu 3 ed. 599p. 1999.

AGRADECIMENTOS

Ao IFAM pela infraestrutura de laboratórios e biblioteca, especialmente à GEAQMA, em cujos laboratórios foi desenvolvido o trabalho; A FAPEAM pelo aporte financeiro para a realização do trabalho;

Ao Prof. Renato Mena Barreto que criou o “Controlador de Processo MENABARRETO”.