

REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica.

DEGRADAÇÃO DE ÍNDIGO CARMIM EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS COM ASPERGILLUS NIGER AN 400 NO TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA TÊXTIL IN NATURA

*Andreza Dnarla Oliveira Santos¹
Alana Mayara Ximenes de Souza¹
Igor do Nascimento Barreto¹
Carlos Ronald Pessoa Wanderle²
Glória Marinho³
Kelly Rodrigues³

INDIGO CARMINE DEGRADATION IN SEQUENCING BATCH
REACTOR WITH ASPERGILLUS NIGER AN 400 IN THE
TREATMENT OF IN NATURA WASTEWATER

Recibido el 27 de noviembre de 2014; Aceptado el 2 de octubre de 2015

Abstract

The textile industry is an important industrial sector. However, it produces large amounts of wastewater containing high concentration of mutagenic and carcinogenic dyes that need to be removed prior to final disposition there of on the environment. In this research, *Aspergillus niger* AN 400 was immobilized in aerobic reactor operated in sequencing batch by adding glucose as cosubstrate for treatment of textile industry wastewater diluted, containing Indigo Carmine (17 mg / L) and concentration of dissolved organic matter in 3492 mg COD / L. The average stain removal was 97% at a wavelength of the chromophore of which only 6% occurred by adsorption of the dye on the material support; 57% average removal of dissolved organic matter; 82.5% ammonia nitrogen and 80% nitrate, resulting in the average concentration in the final effluent of 14.12 mg /L and 0.23 mg / L, respectively. The system was capable of good removal of nitrogen and Indigo Carmine, further optimization of its operation is necessary in order to increase the efficiency of removal of organic matter especially the by-products formed from degradation of the dye.

Keywords: Indigo carmine, fungal degradation, sequencing batch reactor.

¹ Instituto Federal do Ceará (IFCE), Campus Fortaleza, Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Maracanaú, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Gestão e Tecnologia Ambiental (PPGTA-IFCE), Campus Fortaleza; Brasil.

*Autor correspondente: Laboratório de Tecnologia Ambiental – LATAM, Instituto Federal do Ceará – IFCE. Av. Treze de Maio, 2081, Benfica, campus Fortaleza. Fortaleza, Ceará, Brasil. Email: kellyarpessoa@gmail.com

Resumo

A indústria têxtil é importante segmento industrial. Contudo, produz grande quantidade de efluentes contendo concentração elevada de corantes mutagênicos e cancerígenos que necessitam ser removidos antes do descarte final destes no ambiente. Nesta pesquisa, *Aspergillus niger* AN 400 foi imobilizado em reator aeróbio operado em bateladas sequenciais, adicionando-se glicose como cossubstrato, para tratamento de efluente de indústria têxtil diluído, contendo Índigo Carmim (17 mg/L) e concentração de matéria orgânica dissolvida de 3492 mg DQO/L. A remoção média de corante foi de 97%, no comprimento de onda do cromóforo, dos quais apenas 6% ocorreu pela adsorção do corante no material suporte; 57% de remoção média de matéria orgânica dissolvida; 82.5% de nitrogênio amoniacal e 80% de nitrato, o que resultou em concentração a média no efluente final de 14.12 mg/L e 0.23mg/L, respectivamente. O sistema foi capaz de boa remoção de Índigo Carmim e nitrogênio, sendo necessário maior otimização de sua operação a fim de aumentar a eficiência de remoção de matéria orgânica e de corante, especialmente de subprodutos da degradação do corante.

Palavras-chave: bateladas sequenciais, Índigo carmim, remediação fúngica.

Introdução

As indústrias têxteis estão entre os segmentos industriais que geram grandes quantidades de efluentes que contêm substâncias potencialmente perigosas para a saúde ambiental, como compostos aromáticos, requerendo tratamento antes de seu lançamento em meio ambiente (Karam *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, a legislação brasileira tornou-se mais restritiva quanto ao tratamento de efluentes lançados em corpos aquáticos. Segundo a Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) do ano de 2011, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, aos padrões e às exigências propostas.

O tratamento dos efluentes de indústria têxtil é bastante complexo, conforme Mantzavinos e Psillakis (2004), pois estes efluentes são caracterizados por concentração de corante, matéria orgânica e salinidade elevadas, alta temperatura e pH variável.

A presença de corante em corpos hídricos afeta não só esteticamente como também altera a transparência da água, a taxa fotossintética e a solubilidade dos gases, como o oxigênio, o que pode exercer efeito danoso sobre a fauna e a flora aquática. Segundo Yang *et al.*, (2009), em tratamentos biológicos convencionais, como lodos ativados e sistemas de biofilmes, com predominância da população de bactérias, tem ocorrido eficiências baixas quanto à mineralização do corante.

Em águas residuárias, o corante pode ainda ser removido por via química e métodos físicos, incluindo a absorção, a coagulação-floculação, oxidação e de métodos electroquímicos, contudo estes métodos apresentam pouca viabilidade diante dos altos custos envolvidos (Khelifi *et al.*, 2009), o que torna crescente a busca por tecnologias menos onerosa e ambientalmente compatíveis (Singh *et al.*, 2014), como a micorremediação, processo biotecnológico no qual se utiliza do metabolismo de fungos para eliminação de poluentes recalcitrantes, com o objetivo com o reduzir sua concentração a níveis aceitáveis.

Além disso, os fungos apresentam naturalmente uma série de características de que os tornam atraentes para a biodegradação, como a capacidade de crescer sob situação de estresse, sendo este crescimento induzido quimioestaticamente em direção à fonte de carbono orgânico por meio do alongamento das hifas que permitem a colonização de grandes áreas e a produção de enzimas potentes (Chander *et al.*, 2004), cuja ação pode ser favorecida mediante a adição de cossustrato de fácil degradação, como glicose e outros açúcares (Singh, 2006).

A utilização da glicose como cossustrato vem sendo testada em pesquisas com reatores fúngicos aplicados à biodegradação de corantes têxteis, pois favorece a produção de enzimas que irão atuar na degradação do corante têxtil (Singh, 2006), constituindo-se uma fonte primária de carbono e energia, indispensável para auxiliar no processo de biodegradação de poluentes recalcitrantes (Kim *et al.*, 1995; Kapdan *et al.*, 2000; Koiani *et al.*, 2013).

De acordo com Khelif *et al.* (2009) maiores remoções de corante requerem uso de maiores concentrações de glicose, porém é importante que não haja repressão por excesso de substrato no meio. Nesta situação, a glicose é utilizada prioritariamente em detrimento do poluente, o que depende de vários fatores, como micro-organismos envolvidos, constituição do meio, da complexidade molecular dos poluentes que se pretende biodegradar, entre outros (Singh, 2006; Rodrigues *et al.* 2011; Barbosa *et al.* 2015).

A gama de fatores interferentes do processo de descoloração aumenta em meios *in natura* e pode contribuir para dificultar a biodegradação, devido à possibilidade da inibição do sistema enzimático dos fungos pela maior presença de bactérias, o que interfere negativamente no desempenho do sistema, restringindo a micorremediação. De acordo com Cardona *et al.* (2009), poucos são os estudos sobre a biodegradação de corantes em águas residuárias reais, sendo importante a observação do desempenho de sistemas com fungos em condições não estéreis.

Assim, foi estudado o tratamento de efluente *in natura* de uma indústria têxtil por reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400, geneticamente modificada, utilizada em trabalhos anteriores para remoção de corante de menor complexidade molecular, como reportado nos trabalho de Rodrigues *et al.* (2011), Barbosa *et al.* (2015).

O Índigo Carmim é muito utilizado na indústria têxtil para tingir *jeans* e é corante reconhecido por se tratar de composto quimicamente estável, sendo a biodegradação dificultada por sua estrutura molecular de grande complexidade. Visou-se o alcance boa eficiência de degradação de Índigo Carmim em água residuária *in natura* e de efluente final clarificado. Foi verificada ainda a ocorrência da mineralização do Índigo Carmim, tendo-se utilizado glicose como cossubstrato, disponibilizada na concentração de 3 g/L.

Material e método

Caracterizações do efluente

A água residuária *in natura* foi coletada semanalmente em uma indústria têxtil localizada no município de Maracanaú-CE, em um tanque de equalização, sendo o efluente caracterizado por intensa coloração azul, devido à presença do corante Índigo Carmim. As análises físico-químicas determinadas foram: matéria orgânica carbonácea bruta e filtrada (DQO), amônia, nitrato e nitrito, as quais foram executadas de acordo com APHA (2005).

A determinação da concentração de corante foi estimada através da espectrofotometria com a leitura em absorbância ($\lambda = 610$ nm), através de uma curva construída, que, a partir de soluções com concentrações conhecidas do corante obtinham-se as absorbâncias correspondentes, estabelecendo, assim, relações entre concentração de corante absorbância (Rodrigues *et al.*, 2011). Foram realizadas varreduras espectrofotométricas nos comprimentos de onda do espectro visível de (200 nm – 1000 nm) observando $\lambda_{\text{máx}}$ 610 nm do corante.

Inóculo

A partir de uma cultura pura de *Aspergillus niger* AN 400, 15 placas de Petri foram esterilizadas em autoclave a 121 °C, durante 20 min. Posteriormente, as placas receberam adição de 25 mL de meio de cultura ágar dextrose *Sabouraud*, também esterilizado nas mesmas condições já mencionadas, e 0,05 g/L de cloranfenicol, assegurando a seletividade do meio para o crescimento de fungos filamentosos. Além do mais, o ágar dextrose *Saboraud* pode ser empregado com êxito no cultivo de fungos filamentosos (Fiuza *et al.*, 2013), de modo que o cultivo do gênero *Aspergillus* tem sido relatado em pesquisas com as de Choi *et al.* (2004), Rodrigues *et al.* (2011) e Wanderley *et al.* (2012).

Assim, com base em Rodrigues e Marinho (2012), após solidificação do meio nas placas, a espécie fúngica foi inoculada no centro da placa com o auxílio de uma agulha de platina. As placas inoculadas com fungos permaneceram por cinco dias em incubadora microbiológica à temperatura de ± 28 °C e, ao final deste período, foi observado o crescimento dos esporos por toda a superfície das placas.

A remoção dos esporos foi feita adicionando-se à superfície das placas solução salina – NaCl a 0,9% (v/v) –, acrescida de solução *Tween* 80, formando lâmina líquida mínima para favorecer a remoção dos esporos por raspagem, com auxílio de alça de Drigalski. Desta forma, foi obtida uma suspensão de esporos.

Posteriormente, para facilitar a quantificação dos esporos, permitindo melhor visualização dos esporos no procedimento de contagem, a suspensão inicial foi agitada em Vórtex e diluída em 1:20, transferindo-se para um tubo de ensaio 50 µL mais 950 µL de solução de *Tween* 80, formando a suspensão utilizada para a contagem.

Para a contagem dos esporos, adicionou-se alíquota de 20 µL da suspensão diluída em câmara de Neubauer, sobre a qual foi alocada lamínula para a leitura em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Os quatros quadrantes das extremidades da câmara foram utilizados para a contagem dos esporos, sendo cada quadrante formado por 16 subcompartamentos para maior facilidade de quantificação.

Foi feita média total a partir da soma dos esporos em cada quadrante e, desse modo, a suspensão de esporos preparada apresentou a concentração de $4,9 \times 10^9$ esporos/mL, valor obtido pela Equação (1), descrita em Wanderley *et al.* (2012).

$$C = N * \text{fator de diluição} * V$$

Equação (1)

Sendo: C: concentração de esporos/mL, N: no. de esporos contados, V: volume da câmara de Neubauer ($2,5 \times 10^5$ mL).

Imobilizações da biomassa em meio suporte

Os procedimentos de imobilização ocorreram de acordo com Silva *et al.* (2012), utilizando-se espuma de poliuretano como material suporte, a qual foi cortada em cubos de 1 cm de arestas.

Foram esterilizados quinze gramas de espumas em autoclave por 20 minutos a 121°C e estas colocadas em saquinhos de polietileno, os quais foram distribuídos equitativamente em três Erlenmeyers com volume de 250 mL cada, tendo-se adicionado ainda 150 mL de meio de crescimento de Rodrigues (2006) e 5 g/L de glicose.

O meio de crescimento possuía (mg/L): Sulfato de magnésio (1); Fosfato de potássio dibásico anidro (0.8); Cloreto de cálcio (0.04); Sulfato de cobre (0.32); Ácido molibídico (0.2); Sulfato de manganês (0.2); Sulfato férrico (0.2) e Sulfato de zinco (0.16) e solução de Vishiniac (1 mL/L).

Nas proximidades do bico de Bunsen, acrescentou-se suspensão de esporos (2×10^6 esporos/mL) ao meio e os Erlenmeyers foram, então, levados à mesa agitadora horizontal (150 rpm), a temperatura ambiente de $\pm 28^\circ\text{C}$, onde permaneceram por 15 dias. Ao completar 48 h, o meio antigo foi substituído por um novo, conforme Rodrigues *et al.* (2011). Após a etapa de imobilização, as espumas foram transferidas para o reator em batelada para a partida do mesmo.

Montagem e operação do reator em bateladas sequenciais

Para a realização do tratamento foi feita a diluição de 20% (v/v), visto que em concentrações maiores foi relatada a falência do reator, com perda acentuada de biomassa (Pires, 2011). Portanto, o efluente utilizado no tratamento teve como base o efluente *in natura*, acrescido de 0.1 g/L de antibiótico (Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica e Estreptomicina base-sulfato) e 3 g/L de glicose, cossustrato empregado. O meio recebeu ainda nutrientes para favorecimento do crescimento microbiano (Tabela 1), conforme e Silva *et al.* (2012) e Santos *et al.* (2014), e teve o pH ajustado em 5, com uso de ácido sulfúrico P.A., valor este dentro da faixa ideal para o metabolismo dos fungos segundo Griffin (1994).

Tabela 1. Nutrientes adicionados ao meio para melhor desenvolvimento microbiano

Composto	Concentração (g/L)
MgSO ₄	0.25
K ₂ HPO ₄	0.20
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.08
H ₂ MoO ₄	0.05
MnSO ₄ .5H ₂ O	0.05
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.05
ZnSO ₄ .7(H ₂ O)	0.04
CaCl ₂ .H ₂ O	0.01

Também foi utilizado 1 mL de solução de *Vishniac* por litro do meio preparado para alimentar o reator durante sua operação, sendo a composição desta de (mg/L): H₃BO₃ (50); FeCl₂. 4H₂O (0,2); ZnCl₂ (50); MnCl₂. 4H₂O (0,5); CuCl₂. 2H₂O (0.38); AlCl₃H₂O (0.9); CoCl₂6H₂O (0.2).

Como reator foi usado frasco de Duran, em vidro, com capacidade total para 5 L, sendo o volume reacional empregado de 4 L, de modo que o afluente ao reator era constituído por 800 mL do efluente têxtil *in natura* e 3200 mL de água da torneira, a fim de resultar em uma diluição de 20% (v/v). Ao longo de 35 dias, o reator foi operado com ciclos reacionais de 48 h. Ao todo foram realizados 15 ciclos.

Teste de adsorção

O teste de adsorção foi realizado em condições abióticas. Em um Béquer de 500 mL foi adicionada a água residuária diluída a 20% (v/v), contendo 3 g/L de glicose (3 g/L) e 0.1 g/L de antibiótico (Benzilpenicilinabenzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica e Estreptomicina base-sulfato), e o material suporte sem biofilme que introduzido após a correção do pH para 5.

Foram retiradas alíquotas de tempo em tempo para a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de λ : 610 nm. O teste teve duração total de 45 minutos, tendo sido retiradas amostras nos tempos pré-estabelecidos de: 1; 3; 5; 9; 13, 30 e 60 minutos. Em seguida as absorbâncias conseguidas foram colocadas na curva de calibração para a determinação da concentração do corante adsorvido com espuma, conforme Rodrigues *et al.* (2011).

Contagem de micro-organismo (fungos e bactérias)

Ao final da operação do reator em bateladas sequenciais, amostras do biofilme foram submetidas ao procedimento de contagem do número de colônias de fungos e bactérias, para determinação da predominância entre os mesmos.

A amostra do biofilme foi desprendida da espuma suporte utilizando-se 60 mL de água destilada estéril (20 °C, a 1 atm) e pérolas de vidro em *Erlenmayer*, realizando agitação manual vigorosa. Posteriormente, 1 mL do conteúdo foi adicionado em tubo com 9 mL de solução salina (0.89%) que foi agitado em vórtex por 10 minutos, retirando-se sucessivamente novas alíquotas de 1 mL e as transferindo para novos tubos contendo a solução salina, os quais foram submetidos à agitação. Deste modo, foram obtidas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} .

Em seguida, 1 mL de cada diluição foi então adicionada às placas que continham meio ou específico para o crescimento de fungos ou de bactérias. Foi empregado para o crescimento de fungos o meio Martin e para o de bactérias o meio Nutriente-ágar, utilizando placas em duplicata.

O meio Martin apresentava a seguinte composição por litro de água destilada (g/L): KH_2PO_4 (1), peptona (5 g), K_2HPO_4 (0,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), glicose (10), extrato de levedura (0,5), rosa bengala (0,033) e ágar-ágar (18). Já o meio nutriente-ágar foi preparado, adicionando-se por litro de água destilada (g/L): bacterioagar (15), extrato de carne (3), peptona (5) e NaCl (8).

Assim, as placas para contagem do número de colônias de fungos e bactérias receberam 10 mL, respectivamente, de meio Martin e Nutriente-ágar, e ainda 0,2 mL de cada diluição seriada, promovendo-se movimentos circulares na forma de um oito para homogeneizar o meio. Posteriormente, as placas foram vedadas, incubadas à temperatura de ± 28 °C. Todo procedimento ocorreu em duplicata.

Após 48 h e 120 h, respectivamente, para bactérias e fungos, foram selecionadas placas que apresentaram número de colônias superior ou igual a 25 e inferior ou igual a 250, faixa ideal para facilitar a contagem (Tortora *et al.*, 2000) que foi feita com auxílio de contador de colônias mecânico. A Equação 2 foi utilizada para obtenção do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), conforme APHA (2005).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{no de colônias} * 5}{\text{fator de diluição}}$$

Equação (2)

Resultados

Houve remoção de corante em todos os 15 ciclos (Figura 1), obtendo-se eficiência média de remoção de 97%, sendo a sua concentração média afluente de 17 mg/L e de 0,6 mg/L, no efluente. As remoções máximas ocorreram nos ciclos 8, 10 e 15, todos estas com eficiência a cima de 98%, de modo que os bons percentuais de remoção foram atribuídos à presença de glicose, inferindo-se que a mesma, na concentração empregada (3 g/L) não exerceu repressão sobre a utilização do corante pelos micro-organismos, tendo sido benéfica ao processo, desempenhando seu papel de cossubstrato, o que foi importante, uma vez que os fungos ao serem expostos a substâncias complexas e recalcitrantes, frequentemente exigem presença de fonte primária de carbono que tem por função auxiliar na degradação do poluente pelo mecanismo de cometabolismo (Singh, 2006).

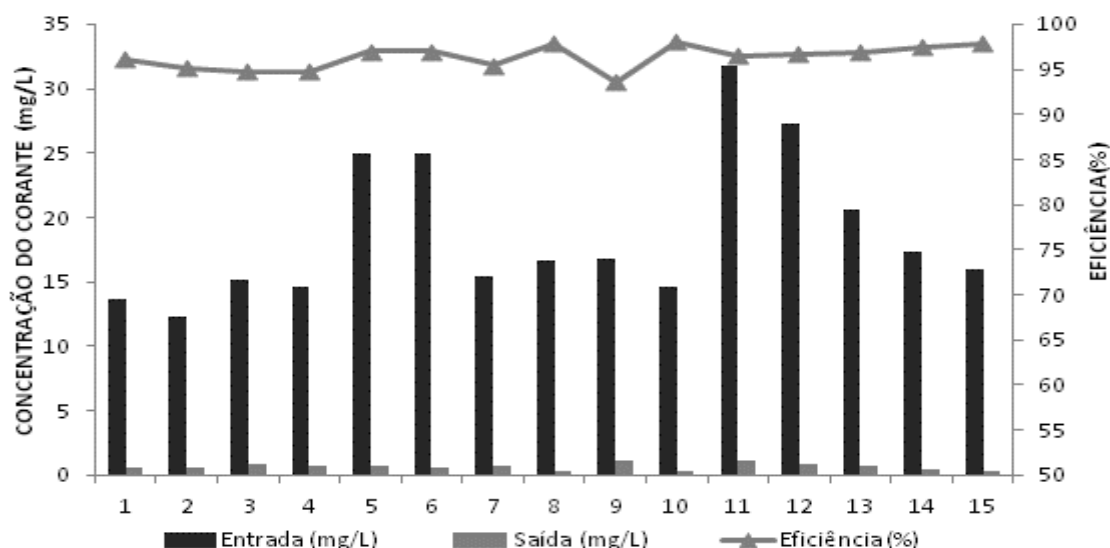


Figura 1. Eficiência de remoção de corante durante os ciclos reacionais na operação do reator RBS com *Aspergillus niger* AN 400

A exemplo disso, MA *et al* (2014) estudaram o efeito da adição de glicose, sacarose, frutose, amido e glicerol, em concentrações não mencionadas pelos autores, na remoção de 1000 mg/L do corante Reactive Orange 16 por *Ganoderma* sp. EN3, em reatores em batelada com biomassa dispersa. Os autores verificaram que todas as fontes primárias de carbono adicionadas influenciaram positivamente na remoção do corante, com destaque para o glicerol, cossustrato que resultou no melhor desempenho de descolorização (92,3%), em 24 horas de reação, contra, aproximadamente, 70% de amido, 22% de glicose, 20% de sacarose e 18% de frutose para este mesmo tempo reacional. Aqueles autores relataram ainda que para maiores remoção do corante a partir de concentrações iniciais elevadas do mesmo, a adição do cossustrato é imprescindível a fim de se obter bons percentuais de remoção, os quais diminuíram consideravelmente para concentração inicial 8 vezes superior a inicialmente empregada (1000 mg/L), chegando a de remoção 74.6% e requerendo um tempo de reação maior, de 96 h.

Sharari *et al.* (2013) comparam a eficiência de remoção da cor de efluente de água residuária de fábrica de papel e de água residuária de lavagem por *Phanerochate chrysosporium* crescendo como biomassa livre e imobilizada, sem a adição de um cossustrato específico. A partir de 500 mg/L do corante, houve remoção de 78% da cor nos reatores com biomassa livre e de 86 mg/L, 83% de remoção de cor, nos reatores onde a biomassa estava imobilizada, ambos em 9 dias de reação. Foi observada redução e o aumento alternado da coloração do meio ao longo do ensaio, o que foi justificado pela fase inicial de tratamento, caracterizada pelos os grupos cromóforos ficarem bioissorvido no micélio, levando a uma rápida diminuição da cor; em seguida, a produção de compostos secundários é responsável pelo ligeiro aumento da cor, que é posteriormente reduzida pela ação do biotratamento, devido à degradação dos grupos cromóforos e outros pigmentos do efluente.

No processo de biodegradação, há maior facilidade na ruptura do grupo cromóforo em relação aos outros componentes da estrutura molecular do corante. Cardona, Osório e Quintero (2009) estudaram a degradação do corante Orange II (100 mg/L) pelos fungos *P. chrysosporium* e *P. sórdida* em meio sintético, cuja composição não foi informada, e alcançaram percentual de 98% de degradação do corante com ambas as espécies, similar ao registrado nesta pesquisa, de 97%, no comprimento de onda relativo ao cromóforo, o que favoreceu a remoção de cor. Os autores utilizaram glicose (10 g/L) como cossustrato e, para um tempo reacional de 9 dias, mencionaram que a degradação do corante Orange II foi quase completa. Porém, a varredura por eles apresentada somente ocorreu a partir do comprimento de onda de 400 nm, não revelando o comportamento nos comprimentos relativos às frações aromáticas, as quais são as que oferecem maior dificuldade de biodegradação.

Na presente pesquisa, não foi observado o aumento da concentração de corante no efluente final dos ciclos reacionais em comparação com sua concentração inicial (Figura 1), o que foi reforçado pela varredura realizada (Figura 2a), nos comprimentos de onda relativos aos componentes da estrutura molecular do Índigo Carmim, a qual revelou ter ocorrido diminuição do comprimento de onda referente ao grupo cromóforo (λ : 610 nm), resultando assim em um efluente final muito clarificado (Figura 2b).

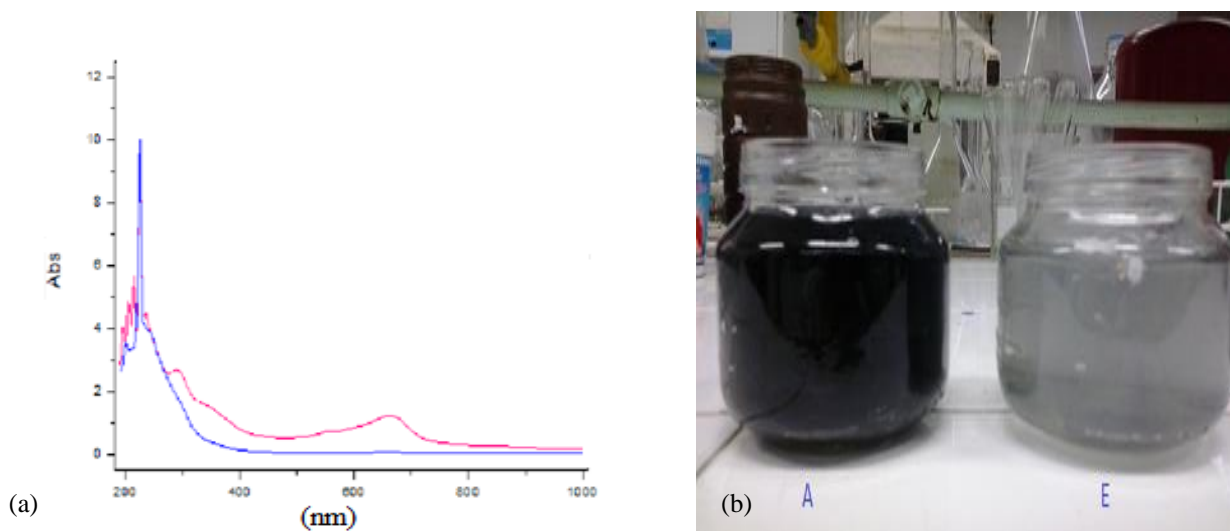


Figura 2. (a) Varredura feita no afluente e efluente do RBS e (b) Amostra da água residuária afluente (A) e do efluente clarificado (E) após o tratamento no reator

A diminuição da banda relativa ao cromóforo em todos os ciclos reacionais indicou que a concentração de glicose (3 g/L), utilizada no estudo, foi adequada para que esta cumprisse seu papel como cossubstrato, tendo, provavelmente, contribuído para a produção de enzimas que agiram na biodegradação do corante, favorecendo ainda o crescimento dos micro-organismos.

Contudo, o anel benzênico, que é uma molécula altamente resistente à ruptura, não foi efetivamente removido do meio (λ : 233 nm), devido à grande estabilidade desta molécula, o que é explicado pela presença das ligações carbono-carbono e da simetria do anel aromático (Trigueiros, 2008).

O ensaio de adsorção no material suporte revelou que cada grama de espuma de poliuretano possuía a capacidade de adsorver 0.0072 gramas de corante, ou seja, considerando que no reator havia 15 g de espuma, a saturação da mesma com o corante, em condição abiótica, ocorreu com 0.108 g de corante.

Assim, ao longo dos 15 ciclos operacionais, foram removidos 1.09 g de corante, valor este que equivale a 0.072 gramas de corante por grama de meio suporte. Desta forma, a quantidade de corante removida pelo sistema foi, aproximadamente, 10 vezes superior à capacidade de adsorção da espuma de poliuretano em relação ao corante, o que permitiu inferir que a maior parcela de corante removida do meio não foi por adsorção no material suporte.

O balanço de massa, feito com os dados de massa de Índigo removida ao longo do tempo de operação do reator, mostrou que, desconsiderando-se a influência da ação microbiana e supondo a existência hipotética de reação irreversível entre a espuma suporte (adsorvente) e o corante (adsorvato), o ponto de saturação no adsorvente foi alcançado no 3º ciclo (Figura 3), quando 0.108 g de corante teriam ocupado todos os sítios ativos da espuma. Assim, da massa total de corante (1.09 g) que foi removida no reator, apenas 6% teria sido por adsorção na espuma, resultando em eficiência média de 91% atribuída à ação microbiana.

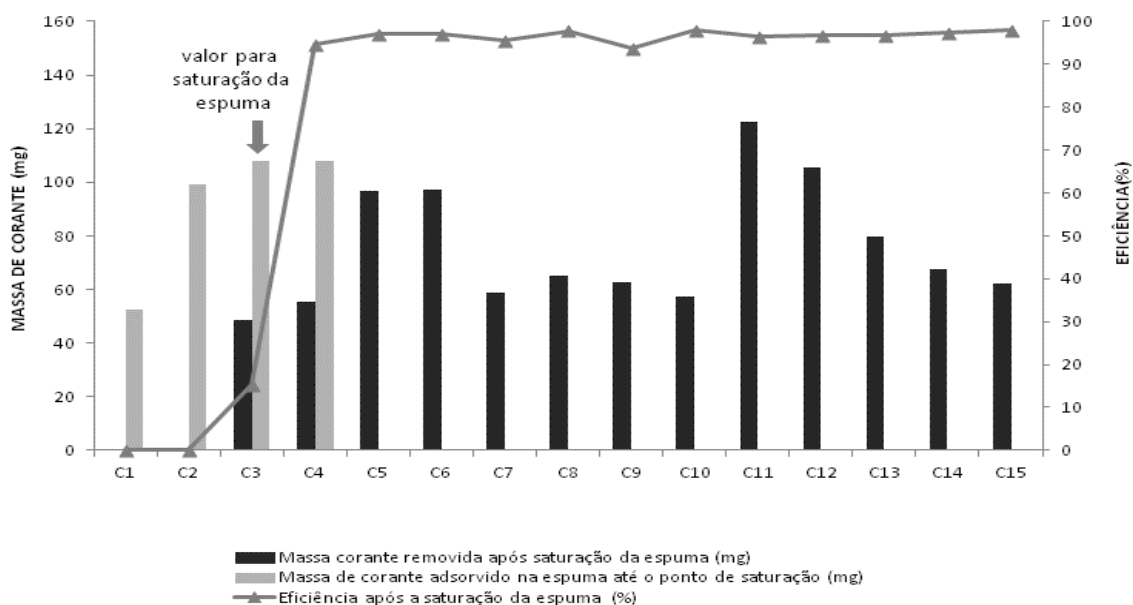


Figura 3. Massa de corante Índigo Carmim removida no reator RBS com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 em ciclos reacionais de 48 h

Em termos de matéria orgânica carbonácea, as eficiências médias foram de 53% e 57%, respectivamente, para DQO solúvel e bruta, resultando em concentração média de matéria orgânica bruta no afluente de 4347 mg/L e de 1852 mg/L no efluente. Já a concentração de matéria orgânica dissolvida foi de 3492 mg/L e 1698 mg/L no afluente e efluente ao tratamento,

respectivamente. A eficiência baixa em relação à remoção de matéria orgânica dissolvida estaria relacionada a subprodutos presentes no meio, além da presença de substâncias excretadas pelos fungos, originadas do seu metabolismo (Wanderley, 2007) ou ainda de lise celular (Djalal *et al.*, 2013).

Em relação à formação de subprodutos, estes seriam oriundos do consumo da glicose e da decomposição da molécula do Índigo Carmim, parcialmente mineralizada, o que foi evidenciado pela dificuldade de ruptura do benzeno, conforme varredura apresentada, ainda que tenham sido registradas remoções de corante em todos os ciclos do estudo, no comprimento de onda relativo ao grupo cromóforo.

Khelif *et al.* (2008) estudaram a descoloração de água residuária contendo Índigo Carmim em sistema aeróbio combinado composto por reservatório de estabilização, seguido por reatores biológicos com biomassa imobilizada em suporte de polietileno, sendo o sistema operado em regime de escoamento contínuo. Os autores alcançaram remoções de matéria orgânica, em termos de DQO, de 97.5% de eficiência, porém o TDH empregado foi de 4 dias, empregado pelo fato do Índigo ser um dos corantes com menor biodegradabilidade.

Assim, o potencial baixo de biodegradação do Índigo Carmim justificaria o menor percentual médio de remoção de matéria orgânica (53%) registrado na presente pesquisa, enfatizando-se que o mesmo foi obtido em um reator de batelada, em um tempo reacional de 48 h, indicando um menor tempo de contato entre substrato e micro-organismos.

Dentre os subprodutos formados pela biodegradação do Índigo, podem estar presentes também ácidos orgânicos, oriundos tanto da utilização do corante como da glicose pelos micro-organismos, o que teria contribuído para o valor médio de pH no efluente (4.3), o qual se manteve sempre na faixa ácida ao longo de toda a operação do reator, indicando a atividade metabólica intensa dos micro-organismos, ressaltando-se a obtenção de maiores percentuais de remoção de corante em meios com pH baixo, entre 5 e 6 (Rodrigues, 2006, Younes *et al.*, 2013).

Segundo Younes *et al.*, (2013), o pH desempenha papel importante nas reações enzimáticas, uma vez que muitas enzimas desenvolvem atividades máximas em um pH particular, de modo que a ação de qualquer enzima a um dado pH dependerá do comportamento ácido-base da atividade enzimática e do substrato.

Paralelamente ao decaimento dos valores de pH, verificou-se a remoção de corante nos ciclos operacionais, como no ciclo 8, quando houve o maior decaimento do valor do pH, de 5.02 para 3.94 e o maior percentual de remoção do Índigo (98%).

Em relação ao nitrogênio, a concentração média de nitrogênio amoniacal no afluente era de 85.9 mg/L e, de apenas 1.11 mg/L, para o nitrato, tendo o sistema alcançado eficiência média de remoção de amônia de 82.5% e de 80%, para o nitrato, com predomínio da assimilação de amônia, forma prontamente utilizada pelos fungos (Griffin, 1994) e abundantemente disponível no meio. O nitrito, composto intermediário da redução desassimilatória do nitrato – via de conversão do nitrato em amônio pelos fungos –, se apresentou no meio em concentrações em torno de 0.067 mg/L.

Após o tratamento no reator, foi produzindo efluente cuja concentração média de nitrogênio amoniacal era de 14.12 mg/L, com concentração máxima efluente de 15.03 mg/L (ciclo 2) e mínima, de 8.8 mg/L (ciclo 1), atendendo ao padrão de lançamento exigido pela Resolução pela legislação brasileira que é de 20 mg/L (CONAMA, 2011).

O desempenho do sistema em relação à remoção de nitrogênio indicou que a concentração de amônia afluente aparentemente não exerceu influência negativa sobre a produção de enzimas fúngicas, pois foram alcançadas boas remoções do corante, de forma que não deve ter ocorrido repressão da atividade enzimática (Levin *et al.*, 2010).

A contagem de colônias dos micro-organismos, no final da operação do reator, ficou muito próxima, 362.500 UFC/mL e de 322.500 UFC/mL, respectivamente, em relação ao número de colônias fúngicas e de bactérias.

Por não ser objetivo do trabalho a manutenção de condições assépticas – o que de fato não ocorre em condições reais –, a contaminação por bactérias ocorreu de forma inevitável, mesmo com a adição de antibiotico, revelando a ação de consórcio microbiano na biodegradação do corante. Porém, Cortazár- Martínez *et al.* (2012) relataram que, devido à complexidade molecular dos corantes têxteis, a ação de consórcios microbianos pode ser benéfica ao processo de biodegradação.

Faz-se importante mencionar que no caso do nitrato, a presença de bactérias poderia aumentar sua concentração no meio, visto que as bactérias fazem o caminho inverso na rota de transformação do nitrogênio, ou seja, a amônia é convertida a nitrido e posteriormente a nitrato, em processo de nitrificação.

Assim, se ação da comunidade bacteriana fosse predominante em relação à de fungos, a concentração de nitrato tenderia a aumentar no meio, o que não ocorreu nesta pesquisa, indicando que a ação dos fungos teria sido de maior predominância, particularmente, quanto à remoção de nitrogênio.

Conclusão

O reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 apresentou bom desempenho quanto à remoção de cor do efluente final pela maior facilidade da ruptura do grupo cromóforo da molécula do Índigo Carmim.

Porém, a mineralização do corante foi parcial, com persistência da banda aromática relativa ao benzeno, fato reforçado pelos valores de matéria orgânica em relação aos de corante no efluente final, atribuída à formação de subprodutos que necessitam ser futuramente investigados.

Além disso, ficou demonstrado que o corante Índigo Carmim foi removido pela ação microbiana, tendo o material suporte sido responsável apenas por parcela muito pequena do corante removido ao longo da operação do sistema.

Quanto aos compostos nitrogenados, a concentração média de amônia no efluente final dos ciclos reacionais atendeu ao limite do padrão de lançamento exigido pela legislação brasileira. Os resultados encontrados para o nitrato endossaram a participação ativa dos fungos dentro do consórcio microbiano que se formou no reator durante o tratamento da água residuária *in natura*, pela condição não estéril do meio.

A fim de fazer um melhor uso desta biotecnologia, necessita-se aprofundar a pesquisa, identificando os subprodutos gerados durante o tratamento empregado e enzimas que participam da biorremediação.

Agradecimentos

À Deus e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e concessão das bolsas de iniciação científica.

Referências

- APHA (2005) *Standard methods for water and wastewater examination*, 21th ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Baccar, R., Blánquez, P., Bouzid, J., Feki, M., Attiya, H., Sarrà, M. (2011) Decolorization of a tannery dye: From fungal screening to bioreactor application. *Biochemical Engineering Journal*, **56**, 184-189.
- Barbosa, B.C.A., Miranda, M.F. De, Gabriele, C.S.M., Rodrigues, K.A.P., Wanderley, C.R.P., Silva, Marinho, G.M. (2015) Uso de etanol como cossustrato para micodegradação de corante azo. *Revista DAE*, **199**, 71-82.
- Cardona, M., Osório, J., Quintero, J. (2009) Degradación de colorantes industriales com hongos lignolíticos, *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, **48**, 27-37.
- Celestino, P., Siqueira, J.P., Lima, P.C., Araujo, R.S., Marinho, G., Rodrigues, K. (2012) Tratamento de água com BTX por reatores em batelada com inóculo fúngico Parte I. In: Rodrigues, K. & Marinho, G. (Eds). *Fungos e águas residuárias industriais: nova tecnologia*, Imprima, Recife, 60-71.

- Choi, J.H., Brummer, E., Stevens, D.A. (2004) Combined action of micafungi, a new echinocadin, and human phagocytes for antifungal activity against *Aspergillus fumigates*. *Microbes and Infection*, **6**, 383-89.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente (2011) Resolução nº 430, 2011 do. Acesso em 30 de novembro de 2015, disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>
- Cortazar-Martinez, C.A., González-Ramírez, Coronel-Olivares, C., Escalante-Lozada, J.A. Castro-Rosas, J, Villagómez-Ibarra, J.R. (2012) Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de La industria textil. *Universida y Ciencia*, **28**, 2, 187-199.
- Griffin, D.H. (1994) *Fungal Physiology*. New York: Wiley-Liss, 458 pp.
- Kamida, H.M., Durrant, L.R., Monteiro, R.T.R., Armas, E.D. (2005) Biodegradação de Efluente Têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. *Química Nova*, São Paulo, **28** (4), 629-632.
- Karam J, Nicell, J.A. (1997) Potential application of enzymes in waste treatment. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, **25**, 141-53.
- Khelifi, E., Ayed, L., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. (2009) Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolorization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*, **163**, 1056–1062.
- Khelifi, E., Gannoun, H., Touhami, Y., Bouallagui, H., Hamdi, M. (2008) Aerobic decolorization of the indigo dye-containing textile wastewater using continuous combined bioreactors. *Journal of Hazardous Materials*, **152**, 683-689.
- Kim, S.J., Kenichi, I., Mitsuyo, H., Makoto, S. (1995). Characteristics of a newly isolated fungus *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *Journal Fermentation and Bioengineering*, **9**, 601-607.
- Koyani R.D., Sanghvi G.V., Sharma R.K., Rajput, K.S. (2013) Contribution of lignin degrading enzymes in decolorisation and degradation of reactive textile dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **77**, 1-9.
- Levin, L., Malignani, E., Ramos, A.M. (2010) Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi: Dye Decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*, **101**, 4554-4563.
- Ma, L., Zhuo, R., Liu, H., Yu, D., Jiang, M., Zhang, X., Yang, Y. (2014) Efficient decolorization and detoxification of the sulfonatedazo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma sp.* en3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. *Biochemical Engineering Journal*, **82**, 1-9.
- Mantzavinos, D., Psillakis, E. (2004) Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pretreatment. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, **79**, 431-454.
- Martins, S.C S., Fiúza, L.M.C.G., Martins, C.M. (2013) Comparação de diferentes meios de cultivo para a avaliação da viabilidade celular de fermentos biológicos. *Enciclopédia Biosfera*, **9** (16), 2078-2486
- Pires, J. (2011) *Avaliação do tratamento de água residuária de indústria têxtil utilizando reatores em batelada inoculados com Aspergillus niger AN 400*. 66p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Gestão Ambiental, Departamento de Química e Meio Ambiente, IFCE), Fortaleza.
- Rodrigues, K.A. (2006) *Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética*. 130p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração em Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo), São Carlos.
- Rodrigues, K., Marinho, G. (2012) *Fungos e Águas Residuárias Industriais: uma nova tecnologia*. Imprima, Recife, 200pp.
- Rodrigues, K.A., Silva, K.M.L., Marinho, G. M., Lima, P.C., Wanderley, C.R.P., Silva, G.M.M. (2011) Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. *Química Nova*, **34**(7), 1119-1123.
- Santos, A.D.O., Souza, A.M.X., Barreto, I.N., Pinho, F., Rodrigues, K.R.A. (2014) A influência da diluição de efluente têxtil *in natura* na biorremediação por *Aspergillus niger* AN 400. XII Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.

- Sharari, M., Roohani, A., Jahanlatibari, A., Guillet, M., Aourousseau, A. (2013) Treatment of bagasse preparation effluent by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam: Enzyme production versus pollution removal. *Industrial Crops and Products*, **46**, 226- 233.
- Silva, K.M.L., Andrade, M.V., Lima, P.C., Wanderley, C.R.P., Marinho, G., Rodrigues, K. (2012). Papel do cossubstrato na remoção de corante têxtil por *Aspergillus niger* AN400 inoculado em reator em bateladas sequenciais. In: Rodrigues, K. & Marinho, G. (Eds), *Fungos e águas residuárias industriais: nova tecnologia*, Imprima, Recife, 137-153.
- Singh, H. (2006) *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. Canada: Wiley, 617pp.
- Singh, A.P, Singh, T. (2014) Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and bioenergy*, **62**, 198-206.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2000) *Microbiology: an introduction*, 6.ed. Porto Alegre, 827pp.
- Trigueros, D.E.G. *Avaliação da Cinética de Biodegradação dos Compostos Tóxicos: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno (BTEX) e Fenol*. (2008) Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, área Desenvolvimento de Processos Químicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná), Curitiba.
- Wanderley, C.R.P. (2007) *Aspergillus niger AN 400 como inóculo de reatores em batelada para remoção do corante vermelho congo em meio aquoso sintético*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará), Fortaleza.
- Wanderley, C.R.P., Araujo, R.S.A., Rodrigues, K., Marinho, G., Mota, S. (2012). Influência do tipo de inóculo (disperso e imobilizado) no tratamento de água residuária têxtil. In: Rodrigues, K., Marinho, G. (Eds). *Fungos e águas residuárias industriais: nova tecnologia*, Imprima, Recife, 112-127,
- Yakubu, M.B. (2007) Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, **6** (24), 2735-2739.
- Yang, Q., Li, C., Li, H., Li, Y., Yu, N. (2009) Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. *Biochemical Engineering Journal*, **43**, 225–230.
- Younes, B. S., Sayadi, S. (2013) Detoxification of Indigo carmine using a combined treatment via a novel trimeric thermostable *laccase* and microbial consortium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **87**, 62-68.