

## REMOÇÃO DE CORANTE POR USO DE *Aspergillus niger* AN400 EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS

Kelly Rodrigues\*, Karla Mayara Lima da Silva, Glória Maria Marinho Silva e Paulo Cesar Cunha Lima

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Fortaleza, Av. Treze de Maio, 2081, 60040-531 Fortaleza – CE, Brasil

Carlos Ronald Pessoa Wanderley e Germana Marinho Silva

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Maracanaú, Av. do Contorno Norte, 61936-000 Maracanaú – CE, Brasil

Recebido em 28/5/10; aceito em 25/1/11; publicado na web em 1/4/11

DYE REMOVAL BY USE OF *Aspergillus niger* AN 400 IN A SEQUENTIAL BATCH REACTOR. A sequential batch reactor (4 L) inoculated with *Aspergillus niger* was operated in order to remove congo red dye ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). The feeding of the reactor was done to each 7 days. The glucose was added in the concentration of  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Stage I) and  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  (Stage II). The Stage III occurred without glucose addition. The Stage I was great to process, because the system reached the greater dye removal (95%) as well as the kinetic parameters were the best –  $K_M$  ( $0.7 \text{ g L}^{-1}$ ) and  $k_1$  ( $0.025 \text{ h}^{-1}$ ).

Keywords: *Aspergillus niger*; sequential batch; congo red.

### INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos do tipo azo ( $-N=N-$ ) representam cerca de 70% do mercado mundial de corantes, sendo estimada a perda em cerca de 10 a 20% de sua massa, principalmente nas etapas secundárias de beneficiamento têxtil,<sup>1,2</sup> o que resulta em preocupação ambiental quando do descarte inadequado dos efluentes têxteis, pois estes corantes possuem como característica a persistência no meio ambiente.<sup>3</sup>

A presença de corantes têxteis em corpos hídricos receptores predispõe à toxicidade a vida aquática e diminui a transparência de água, afetando o processo de fotossíntese e a concentração de oxigênio dissolvido que é essencial à biota.<sup>3,4</sup>

Vários processos físico-químicos têm sido utilizados visando o tratamento destes despejos – coagulação, seguida de flotação ou sedimentação, adsorção em carvão ativado,<sup>5</sup> processos oxidativos avançados,<sup>6,7</sup> sistemas eletroquímicos,<sup>8</sup> entre outros. Porém, esses processos apresentam custo elevado e baixa eficiência para remoção de cor e matéria orgânica dissolvida, além de não serem destrutivos, o que faz com que a disposição da fase sólida se constitua em outro aspecto negativo do tratamento físico-químico.<sup>7-9</sup>

Em relação aos processos biológicos, os sistemas anaeróbios e aeróbios – fundamentados na ação de bactérias – podem alcançar bons níveis de eficiência quando utilizados em conjunto, mas, separadamente, não apresentam percentuais de remoção satisfatórios.<sup>10,11</sup> Em ambiente anaeróbio, a partir da clivagem da molécula do corante, são formadas aminas aromáticas cancerígenas, que são ainda mais difíceis de serem degradadas, exigindo o pós-tratamento do efluente em unidades aeróbias,<sup>12,13</sup> como, por exemplo, o sistema de lodos ativados, que é muito empregado para o pós-tratamento desses efluentes. Mas esse sistema, apesar dos bons resultados em relação à remoção de cor, apresenta produção de lodos elevada e é susceptível a choques de carga orgânica.<sup>14,15</sup>

Apesar de recente, em comparação com outros sistemas biológicos, a utilização de fungos na biorremediação de poluentes tem sido relatada na literatura especializada devido ao potencial enzimático desses micro-organismos.<sup>16</sup>

As espécies de *Aspergillus* são conhecidas por sua capacidade de utilizar de corantes como substrato, transformando-os em compostos não tóxicos ou de baixa toxicidade,<sup>17,18</sup> o que ocorre pela produção de enzimas extracelulares, as quais tornam o organopoluente acessível para assimilação.<sup>16</sup> A espécie *Aspergillus niger*, em função das condições do meio, é capaz de produzir mais de 19 enzimas diferentes, tais como celulases, peroxidases, lactases, lacases e amilases.<sup>19,20</sup>

O uso de reatores com fungos para o tratamento de despejos industriais pode vir a ser uma tecnologia econômica e eficiente. Entretanto, um dos maiores problemas para a sua viabilidade é a falta de consenso sobre as condições operacionais ótimas, em busca da completa mineralização do poluente, o que pode variar em função do substrato e da espécie utilizada.<sup>19</sup>

Desta forma, há a necessidade de se estudar a otimização do processo de degradação de corantes por *Aspergillus niger*, bem como por outras espécies de fungos, geneticamente modificadas ou não, haja vista o potencial reconhecido destes micro-organismos na biorremediação de corantes têxteis e de muitos outros compostos.

Durante a operação de reatores com fungos são observados alguns problemas como crescimento excessivo da biomassa, limitação difusional e perda da eficiência do tratamento de efluentes de complexidade elevada.<sup>21</sup>

Sobre esse aspecto, exige-se que todas as variáveis envolvidas no processo de microrremediação sejam investigadas, a fim de que os reatores com inóculo fúngico, quando da operação em macroescala, venham a ser viáveis e possam ser estabelecidos competitivamente no processamento eficiente dos grandes volumes dos despejos gerados.

Podem-se citar como alvo de estudo desse processo: o tempo reacional e o tempo de detenção hidráulica, respectivamente, para reatores em batelada e os de escoamento contínuo; o uso de espécies geneticamente modificadas visando o maior rendimento do processo; a influência do tipo da concentração de cossustrato sobre a velo-

\*e-mail: kelly@ifce.edu.br

cidade da degradação do poluente e a eficiência global e o nível de mineralização do poluente, entre outras.<sup>16,21,22</sup>

Dentro deste contexto, a adição de cossubstrato é de grande importância, pois pode contribuir para maiores eficiências de remoção dos corante e de seus intermediários, devido à formação de compostos altamente reativos pela adição de glicose, os quais podem melhorar a assimilação dos poluentes pelos fungos e diminuir a toxicidade do meio.<sup>22</sup>

Assim, considerando o uso de um reator em bateladas sequenciais, inoculado com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN400, de linhagem fúngica geneticamente modificada, não produtora de antígenos, e com capacidade para produção de ácidos orgânicos a partir de substratos variados, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o tratamento de meio sintético contendo corante vermelho do congo.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Inóculo

A linhagem *Aspergillus niger* AN400 foi desenvolvida no Departamento de Genoma de Fungos da Universidade de Wageningen, na Holanda. De saída, encontrava-se na forma de esporos, armazenada em tubo de ensaio (10 mL), mantido a  $\pm 4$  °C, depois submetida a um descongelado à temperatura ambiente para produção de maior quantidade de suspensão de esporos.

O cultivo dos fungos foi feito em 8 placas de Petri que foram preenchidas com 20 mL de meio cultura *Saboraud Dextrose* e, após solidificação do meio, uma alça estéril de platina foi imersa no frasco que continha a solução de esporos original e a amostra retirada foi repicada no centro das placas. Todos os procedimentos de cultivo e repicagem ocorreram na proximidade de bico de Bunsen.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de  $\pm 30$  °C, onde permaneceram durante 5 dias para crescimento dos esporos. Após esse período, os esporos foram removidos das placas com auxílio de alça de Drigalsky e de solução Tween 80 e transferidos para recipiente de armazenamento.

A contagem do número de esporos presentes na suspensão foi realizada em microscópio óptico, aumento de 400 vezes, com ajuda de câmara de Neubauer.

### Meio basal

O meio foi preparado com água da torneira, acrescida de (mg L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (500), NaNO<sub>3</sub> (250), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (200), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (250) e CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (10), CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (80), H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (50), MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (50), Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (50), ZnSO<sub>4</sub> (40).

### Reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (RBI)

#### Imobilização da biomassa

A espécie mutante *Aspergillus niger* AN400 foi imobilizada em espuma de poliuretano cortada em cubos de 1 cm de aresta, previamente esterilizada a  $\pm 121$  °C por 20 min.

Para o procedimento de imobilização, frascos (erlenmeyer) de 250 mL receberam adição de 150 mL de meio basal descrito anteriormente, 5 g L<sup>-1</sup> de glicose e de inóculo, na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>.

Os erlenmeyers foram mantidos em mesa agitadora horizontal, sob agitação orbital de 150 rpm e temperatura de  $\pm 28$  °C, durante 72 h. Ao completar 24 h, o meio antigo foi substituído por um novo de mesma composição, permanecendo nesta condição por mais 72 h.

Ao fim desse tempo, as espumas que continham a biomassa fúngica aderida à sua superfície foram lavadas com água destilada e transferidas para o reator em batelada para o início da operação do mesmo.

#### Montagem e operação do reator

O reator de batelada sequencial era de vidro e possuía volume total de 5 L. Sua alimentação foi feita com o meio basal, contendo 10 mg L<sup>-1</sup> do corante vermelho do congo, além de glicose cuja concentração variou em função da etapa operacional (Etapas I, II e III), conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição dos ciclos de operação do reator em regime de batelada sequencial, em função da concentração da glicose

Etapa	Ciclo	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Tempos de reação estudados (dias)
I	1	1,0	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7
	2		
	3		
II	1	0,5	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7
	2		
	3		
III	1	-	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7
	2		
	3		

Cada etapa era compreendida de três ciclos operacionais e em cada um dos ciclos o reator foi alimentado com 4 L do meio, com retirada de alíquota a cada 24 h para monitoramento, sendo o tempo reacional total de 7 dias.

O volume amostral retirado para a realização das análises foi de apenas 10% do volume útil do reator por ciclo estudado. O ar foi fornecido por minicompressor e difundido no meio por pedra porosa. O reator foi coberto com sacos pretos de polietileno, a fim de evitar a possibilidade de ocorrer fotodegradação pela ação da luz ambiente.

Foram realizadas as análises de corante, de matéria orgânica dissolvida – em termos de DQO – e pH, segundo os procedimentos descritos em APHA,<sup>23</sup> exceto a de corante.

A determinação da concentração de corante ocorreu por método espectrofotométrico. Estabeleceu-se a relação entre a absorbância e o equivalente em termos de concentração de corante e construiu-se a curva de calibração.

Para a curva de calibração foram utilizadas soluções de concentrações conhecidas de vermelho do congo, variando de 0 (branco) a 15 mg L<sup>-1</sup>, sendo que, antes da leitura em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm, durante 15 min.

A partir dos dados de absorbância *versus* concentração de corante adicionado, foi obtida a equação que estabeleceu a relação entre concentração de corante equivalente e absorbância.

#### Análises microscópicas

Foram retiradas amostras do biofilme para realização de exames microscópicos, no final da operação do reator.

O biofilme aderido à manta suporte foi removido com ajuda de pérolas de vidro e água destilada esterilizada a 121 °C a 1 atm. Posteriormente, foram feitas diluições de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> e, em seguida, foi retirado 1 mL de cada diluição para adição em placas de Petri que continham 20 mL de meio Saboraud, sendo ao todo 9 placas – 3 placas para cada diluição – que foram mantidas em estufa a  $\pm 30$  °C por 7 dias, para verificação das colônias.

Amostras das placas que receberam as diluições foram fixadas em lâminas com ágar, realizando-se, em seguida, a microscopia em microscópio óptico Acrom L1000, com aumento de até 1600 vezes a fim de identificar com base nas estruturas morfológicas os micro-organismos presentes no reator.

### Contagem dos micro-organismos em placas

A contagem e o plaqueamento de micro-organismos foram feitos com procedimento de diluição em série, com uso do meio seletivo de Martin para fungos, o qual foi preparado com 1000 mL de água destilada e os seguintes constituintes ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1); peptona (5);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5); dextrose (10); extrato de levedura (0,5); rosa bengala (0,033) e ágar (18). O antibiótico estreptomicina ( $3\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi adicionado ao meio para evitar contaminação por bactérias.

Foram retiradas amostras de 10 mL do conteúdo líquido do reator em operação no último ciclo operacional da Etapa II, misturando-se as mesmas a 90 mL de solução salina (0,89%) em tubo de ensaio de 20 mL, que foi submetido à agitação em vórtex, durante 10 min.

Em seguida, alíquotas de 1 mL foram transferidas para um novo tubo de ensaio, contendo 9 mL da solução salina e, após agitação manual, procedeu-se assim sucessivamente de forma a se obterem concentrações de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 mL foram retiradas de cada uma destas diluições e adicionadas às placas contendo o meio Martin, de que foram obtidas concentrações de respectivamente de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ .

Para promover o espalhamento das colônias na superfície das placas, foi utilizada alça de Drigalski. Posteriormente, as placas foram vedadas e incubadas à temperatura de 28 °C durante 5 dias para permitir o crescimento das colônias fúngicas.

A contagem foi realizada pela identificação visual de pontos de colônias de fungos, formados nas placas, após o período de incubação. O número de colônias foi multiplicado pelas diluições correspondentes à cada placa.

### Ensaio de adsorção no micélio morto

Para o ensaio de adsorção do corante vermelho do congo, utilizou-se 0,9 g de biomassa morta de *Aspergillus niger* AN400.

Primeiramente, foi realizado o ensaio com biomassa morta, que foi produzida a partir do cultivo de biomassa com adição de  $2 \times 10^6$  esporos/mL e de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose em três erlenmeyer de 250 mL, contendo cada um 200 mL do meio basal, descrito anteriormente, tendo sido o mesmo previamente esterilizado a 121 °C, durante 20 min. Todo procedimento foi realizado em uma câmara de fluxo laminar.

Os erlenmeyers foram postos sob agitação em uma incubadora de bancada para crescimento da espécie fúngica a 125 rpm e temperatura de 29,6 °C, durante 7 dias, para crescimento da espécie.

Após esse período, a massa fúngica produzida foi morta por autoclavagem a 121 °C, durante 30 min. A biomassa foi então lavada e ainda filtrada em sistema de filtração a vácuo, para retirada de umidade, permanecendo em estufa, a  $\pm 55$  °C, até obtenção do peso seco.

Para o ensaio de adsorção a biomassa morta de *Aspergillus niger* NA 400 foi introduzida em erlenmeyer de 250 mL, com volume reacional de 200 mL e  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  de vermelho do congo. O monitoramento da concentração do corante adsorvido na biomassa morta foi realizado com base na medida da sua concentração no meio, com leituras em intervalos de 30 min, até se atingir a saturação da mesma e se obter a massa total de corante, bem como a capacidade de adsorção do micélio.

### Ensaio de adsorção no material suporte

Foram utilizados 5 g de cubos de espuma de poliuretano previamente secos em estufa a  $\pm 55$  °C. Os cubos foram adicionados em erlenmeyer de 250 mL, que receberam 200 mL do meio basal acrescido de  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  de vermelho do congo.

A capacidade máxima de adsorção do corante na espuma de poliuretano empregada como material suporte foi feita de modo similar ao ensaio de adsorção com o micélio morto.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são apresentadas as características do meio utilizado para alimentação do reator em bateladas sequenciais, nas Etapas I, II e III.

A concentração média inicial de corante no meio foi de  $10 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$  e os valores iniciais de pH foram característicos de meio ácido, de 5,6; 3,7 e 4,3, respectivamente, nas Etapas I, II e III. Estes valores são benéficos aos fungos, que possuem grande capacidade metabólica em meios ácidos.<sup>24</sup> Além disso, o pH baixo se constituiu em um fator minimizador da atividade de eventuais bactérias contaminantes.<sup>16</sup>

Em relação às etapas estudadas, verificou-se que os melhores resultados foram alcançados com a adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glicose (Etapa I), quando foi registrada eficiência média de remoção de corante de 95%, sendo que o percentual máximo de remoção foi obtido ainda no primeiro ciclo (96%), no tempo reacional de 168 h.

Nas Etapas II e III, os percentuais de remoção do corante foram, respectivamente, de 90 e 89%, indicando que a adição de glicose, na concentração de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , não apresentou resultados muito diferentes da situação em que a mesma não foi adicionada no meio, o que foi endossado pelo coeficiente de velocidade ( $k$ ) – considerando a reação de primeira ordem, de acordo com a Equação 1 –, de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ , em ambas as etapas.

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k_1 \cdot \Delta t \quad (1)$$

**Tabela 2.** Características do meio basal contendo o corante vermelho do congo nas Etapas I, II e III de operação do reator em batelada sequencial

Variável	ETAPA					
	I	DP	II	DP	III	DP
pH	4,1	$\pm 0,3$	4,0	$\pm 0,5$	4,0	$\pm 0,5$
Corante ( $\text{mg L}^{-1}$ )	8	$\pm 1,5$	10	$\pm 2,5$	11,0	$\pm 5$
DQO dissolvida ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1034	$\pm 130$	423	$\pm 239$	51	$\pm 10$
Amônia total ( $\text{mg L}^{-1}$ )	711	$\pm 28$	758	$\pm 48$	638	$\pm 33$
Nitrito ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0,034	$\pm 0,01$	0,17	$\pm 0,20$	0,07	$\pm 0,04$
Nitrato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2	$\pm 1$	5	$\pm 2,5$	7	$\pm 3,4$
Ortofosfato ( $\text{mg L}^{-1}$ )	955	$\pm 197$	943	$\pm 212$	1034	$\pm 80$

sendo C a concentração do corante no tempo t; C<sub>0</sub> a concentração inicial do corante; k<sub>1</sub>, constante de velocidade e Δt, a variação entre o tempo inicial e final.

Em contrapartida, o coeficiente de velocidade (k<sub>1</sub>), registrado na Etapa I foi de 0,025 h<sup>-1</sup>. Este valor foi cerca de 2,5 vezes superior ao encontrado nas Etapas II e III, mostrando que a concentração de 1 g L<sup>-1</sup> de glicose proporcionou maior eficiência para o processo.

Na Tabela 3 são mostrados os valores médios para a constante de velocidade (k<sub>1</sub>) e para o coeficiente R<sup>2</sup>, obtidos nas etapas de estudo, em relação ao consumo de vermelho do congo e de matéria orgânica.

**Tabela 3.** Valores médios de k<sub>1</sub> e de r<sup>2</sup> para o corante vermelho do congo e de matéria orgânica, obtidos nas Etapas I, II e III

Variável		ETAPA		
		I	II	III
Corante	k <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,025	0,01	0,01
	R <sup>2</sup>	0,847	0,876	0,953
Matéria orgânica	k <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,048	0,015	0,015
	R <sup>2</sup>	0,882	0,816	0,905

Há relatos do aumento da eficiência para a remoção de cor pela adição da glicose em meios contendo os mais diversos corantes.<sup>22,25-27</sup> Porém, a maioria dos fungos, na ausência de cossustrato, como a glicose, não consegue utilizar corantes têxteis em seu metabolismo, necessitando da presença de fonte de carbono de fácil assimilação.<sup>22,28</sup>

A glicose é o substrato de mais fácil assimilação, sendo exaurida muito rapidamente do meio. Frequentemente, em 2 dias, nos reatores de baletada operados a uma concentração inicial de 5 g L<sup>-1</sup>,<sup>16</sup> favorecendo o crescimento dos fungos e a produção de enzimas extracelulares.<sup>22</sup>

Entretanto, a concentração ótima do cossustrato a ser empregada depende da espécie fúngica, da estrutura molecular do corante, do regime de operação do reator e da idade do biofilme, entre outros fatores. Seu excesso no meio, porém, pode acarretar a repressão do sistema enzimático e da utilização do substrato.<sup>22</sup>

Ali et al.<sup>29</sup> verificaram que a partir de 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, o efeito indutor desta foi revertido, de modo que *Aspergillus niger* não conseguiu eficiente remoção da cor de meio que continha 20 mg L<sup>-1</sup> do corante diazo vermelho ácido 151, obtendo remoção de apenas 33,2%, em tempo reacional de 8 dias. Por outro lado, ao se adicionar 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, os autores obtiveram aumento da eficiência para 77%, mostrando a importância da concentração do cossustrato para a eficiência do sistema, uma vez que o mesmo se constituiu em um indutor enzimático.<sup>22</sup>

Nesta pesquisa, a adição de 1 g L<sup>-1</sup> de glicose não foi suficiente para prover a utilização efetiva do benzeno, embora tenha contribuído para a ruptura dos grupos cromóforo da ligação azo (λ: 500 nm) e do naftaleno (λ: 310 nm) – não detectados no efluente –, tendo-se obtido diminuição pequena, 30% do valor relativo à sua absorbância no comprimento de onda (λ) de 233 nm.

Os fungos atuam sobre o corante a partir da ação de enzimas como peroxidases e fenoxidases por eles produzidas, as quais contribuem para a clivagem assimétrica da ligação azo, formando quinonas e derivados do diazeno, além de ocorrer liberação de nitrogênio.<sup>28</sup> É relatada a produção de metabólitos diversos na biodegradação de corantes azo, inclusive, muitos destes ainda não foram identificados, mas observada a produção de ácido hidroxibenzoico, álcool *m*-benzyl, acetanilida, entre outros.<sup>22</sup>

A desestabilização do benzeno, por sua vez, apresenta maior grau de complexidade, pois o anel sozinho é muito estável e, para sua clivagem, é necessária maior reatividade dessa molécula, o que pode ser obtido com o aumento da glicose no meio até a concentração

ótima para a indução enzimática, visto que sua presença resulta na formação de compostos altamente reativos que facilmente se envolvem em reações secundárias com compostos mais persistentes como o benzeno, aumentando a capacidade de mineralização do sistema.<sup>22,30</sup>

Na presente pesquisa, quanto à influência do material suporte e à do próprio micélio fúngico de adsorver o corante, os ensaios de adsorção realizados mostraram que os mesmos tiveram pouca influência na remoção do corante. A capacidade máxima do material suporte e a do micélio morto em adsorver o vermelho do congo era de, respectivamente, 0,005 g de corante/g de espuma e de 0,06 g de corante/g de micélio.

O sistema removeu 0,08 g de corante por grama de espuma, o equivalente a uma massa 4 e 3 vezes maior que a retida pelo material suporte no ponto de saturação da espuma suporte e que a do micélio morto, respectivamente, considerando que havia ao final do experimento 0,50 g de biomassa no interior do reator, crescendo aderida ao material suporte.

Mesmo no primeiro ciclo da Etapa I, no qual foram observadas as maiores remoções de corante e a ação da adsorção poderia ser maior, em virtude da disponibilidade elevada de sítios de ligação no material suporte, houve remoção de 0,008 g de corante por grama de espuma, o que equivale à remoção de 1, 6 vezes a massa de corante que a espuma de poliuretano é capaz de adsorver.

Na Etapa I foram também registradas as melhores remoções de matéria orgânica carbonácea, medida em termos de DQO. O maior percentual de remoção de matéria orgânica ocorreu no tempo reacional de 96 h do primeiro ciclo (99%) e a remoção média de matéria orgânica foi de 86%, obtendo-se coeficiente de velocidade k<sub>1</sub> de 0,048 h<sup>-1</sup>.

Ainda nesta pesquisa, os resultados estimados para a constante cinética de Michaelis-Menten (K<sub>M</sub>) pelo ajuste dos dados de decaimento de corante na equação linearizada de Hanes Woolf (Equação 2), ratificaram o alcance da melhor eficiência do tratamento na Etapa I, para a qual foi encontrado o valor mais baixo de K<sub>M</sub>, de 0,7 g L<sup>-1</sup> (r<sup>2</sup>: 0,871), indicando que a glicose, adicionada na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>, foi melhor para o processo.

$$\frac{C_s}{r} = \frac{K_M}{r_{\max}} + \frac{1}{r_{\max}} C_s \quad (2)$$

sendo C<sub>s</sub> a concentração do corante; K<sub>M</sub> a constante de Michaelis-Menten ou de afinidade pelo substrato; r a velocidade de remoção do corante e r<sub>max</sub> a velocidade máxima de remoção do corante.

Ao diminuir a concentração de glicose para 0,5 g L<sup>-1</sup> (Etapa II), a constante K<sub>M</sub> foi de 1,1 g L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>: 0,799), valor este 1,5 vezes superior ao registrado na Etapa I. Contudo, o pior resultado foi obtido na ausência do cossustrato, K<sub>M</sub> de 14 g L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>: 0,837), quase 20 vezes superior ao encontrado para a Etapa I. Estes resultados novamente confirmaram que a presença da glicose (1 g L<sup>-1</sup>) foi benéfica para a eficiência de remoção do corante pelos micro-organismos.

Radha et al.<sup>31</sup> verificaram afinidade elevada de fungos pelo corante vermelho do congo (0,02 g L<sup>-1</sup>), na presença de glicose (5 g L<sup>-1</sup>) em meio mineral. Utilizaram a espécie *Phanerochaete chrysosporium* imobilizada em esferas de alginato de sódio (2, 3, 4, 5 e 6 mm), tendo obtido para a constante de afinidade (K<sub>M</sub>) valores variando de 0,203 a 0,253 g L<sup>-1</sup>, em função do tamanho das esferas. Estes valores foram de 3 a 4 vezes menores que os encontrados na presente pesquisa, nas Etapas I e II, porém é importante ressaltar que foi utilizada concentração 5 vezes menor de glicose (1 g L<sup>-1</sup>), de modo que ainda assim foram obtidos bons percentuais médios de remoção do vermelho do congo (95%) e de matéria orgânica (86%).

Em relação ao pH, ao longo dos ciclos operacionais foi mantida a característica ácida do meio, o que foi observado em todas as Etapas

de estudo, resultando em valor médio de 2,5 (Etapa I), 3,1 (Etapa II) e 4,1 (Etapa III).

A diminuição dos valores de pH no final dos ciclos operacionais está, possivelmente, relacionada à produção de ácidos orgânicos, devido à utilização das fontes de carbono pelos fungos.<sup>24</sup> De fato, na Etapa I, quando houve maior remoção de corante do meio, estes valores foram menores, variando de 1,8 a 4.

Wanderley<sup>32</sup> estudou a remoção de vermelho do congo por *Aspergillus niger* em reatores em batelada, utilizando biomassa imobilizada e glicose (1,0 g L<sup>-1</sup>) como cossubstrato. Os reatores foram operados durante 25 dias e as maiores eficiências, quanto à remoção do corante (85 e 87%), ocorreram quando o meio apresentou pH baixo (3,2 a 3,7). O valor do pH nos reatores utilizados como controle foi superior a 7 e não foi observada remoção significativa de corante (12%).

Michniewicz *et al.*<sup>33</sup> obtiveram maior eficiência de remoção dos corantes têxteis azul ácido 62 (125 µM) e 40 (211 µM), azul reativo 81 (124 µM) e preto direto (92,25 µM) em meio aquoso, na condição de pH baixo, por enzimas lacases, produzidas pelo fungo *Cerrena unicolor*. Variaram o pH do meio de 2 a 7 e alcançaram maior produção de lacase em pH 3,5, correspondendo a 100% da atividade enzimática, a qual diminuiu drasticamente em pH 7 para apenas 20% do valor inicial.

Os meios com valores baixo de pH são mais propícios aos fungos<sup>24,34</sup> e grande número de enzimas secretadas por eles possuem sua atividade ótima em pH cujos valores se encontram na faixa ácida, sendo que a partir de 7 a atividade enzimática tende a diminuir,<sup>33</sup> ocorrendo, conseqüentemente, a perda da eficiência da remoção do poluente.

No final da operação do reator, as análises de microscopia confirmaram a presença do *Aspergillus niger* AN400 e não foi observada contaminação do meio por micro-organismos alóctones. A contagem do número de colônias revelou concentração de esporos por mL de  $8 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## CONCLUSÕES

O reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada da linhagem mutante *Aspergillus niger* AN400 apresentou boa eficiência quanto à diminuição da concentração de vermelho do congo (95%) e de matéria orgânica carbonácea (86%), obtidos na Etapa I.

Quando da adição da glicose na menor concentração estudada (0,5 g L<sup>-1</sup>), a remoção de corante não diferiu da registrada sem a presença de glicose no meio, o que foi endossado pelos parâmetros cinéticos estimados, tanto pelo coeficiente de velocidade  $k_1$  (0,01 h<sup>-1</sup>), como pela constante  $K_M$  – 1,1 e 14 g h<sup>-1</sup>, respectivamente, nas Etapas II e III.

O uso da glicose como cossubstrato, na concentração de 1 g L<sup>-1</sup> (Etapa I), resultou nos maiores valores estimados para a velocidade de remoção de corante ( $k_1$ : 0,025 h<sup>-1</sup>) e para a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), a qual foi de 0,7 g L<sup>-1</sup>. Porém, não houve mineralização completa do poluente, uma vez que, apesar de se ter constatado a eliminação da ligação azo e do anel naftaleno, o anel benzeno não foi efetivamente removido do meio.

Os resultados obtidos na pesquisa indicam a necessidade da continuidade dos estudos sobre a concentração ótima de glicose, bem como de outros tipos de cossubstrato, a fim de viabilizar a operação eficiente do sistema, prevendo a mineralização total do corante no efluente final.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo financiamento da pesquisa (Processo no 567552/2008, Edital Jovens Pesquisadores), e à FUNCAP pela concessão de duas bolsas de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

1. Yang, Q.; Li, C.; Li, H.; Li, Y.; Yu, N.; *Int. Biodet. Biodegradat.* **2009**, *63*, 280.
2. Levin, L.; Papinutti, L.; Forchiasin, F.; *Bioresour. Technol.* **2004**, *94*, 169.
3. Ozfer, Y.; Asma, D.; Cing, S.; *Process. Biochem.* **2003**, *38*, 933.
4. Aksu, Z.; Dönmez, G.; *Chemosphere* **2003**, *50*, 1075.
5. Kunz, A.; Peralta-Zamora, P.; Moraes, S. G.; Durán, N.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 78.
6. Souza, K. V. de; Peralta-Zamora, P.; Zawadzki, S. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1145.
7. Salgado, B. C. B.; Nogueira, M. I. C.; Rodrigues, K. A.; Sampaio, G. M. M. S.; Buarque, H. L. de B.; Araújo, R. dos S.; *Eng. Sanit. Ambient.* **2009**, *14*, 1.
8. Lucas, M.; Jeremias, P. F. P. T.; Andreas, J.; Barcellos, I. O.; Peralta-Zamora, P.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1366.
9. Oliveira, D. M.; Leão, M. D.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2282.
10. Khelifi, E.; Ayed L.; Bouallagui, H.; Touharni, Y.; Hamdi, M.; *J. Hazard. Mater.* **2009**, *163*, 1053.
11. Barbosa, B. C. A.; Vidal, C. B.; Wanderley, C. R. P.; Marinho, G.; Rodrigues, K.; *Conexões: Cienc. Tecnol.* **2010**, *3*, 40.
12. van der Zee, F.; Villaverde, S.; *Water Res.* **2005**, *39*, 1425.
13. Mustafa, I.; Sponza, T. D.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *34*, 122.
14. Hassemer, M. E. N.; Senz, M. L.; *Eng. Sanit. Ambient.* **2002**, *7*, 30.
15. Souza, S. M. A. G. U.; Bonilla, K. A. S.; *J. Hazard. Mater.* **2010**, *179*, 35.
16. Rodrigues, K. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.
17. El-Rahim, W. M. A.; El-Arady, O. A. M.; Mohammad, F. H. A.; *Desalination* **2009**, *249*, 1206.
18. Parshetti, G. K.; Kalme, S. D.; Gomare, S. S.; Govindwar, S. P.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 3638.
19. Spier, M. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2005.
20. Fasanella, C. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
21. Franciscon, E.; Zille, A.; Guimaro, F. D.; Regagnin, C. de M.; Durrant, L. R.; Cavaco, P. A.; *Int. Biodet. Biodegradat.* **2009**, *63*, 280.
22. Singh, H.; *Mycorremediation*, Wiley: New Jersey, 2006.
23. APHA; *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21<sup>th</sup> ed., American Health Association: Washington D. C., 2005.
24. Griffin, D. H.; *Fungal physiology*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley: New York, 1994.
25. Steffan, S.; Bardi, L.; Marzona, M.; *Environ. Int.* **2005**, *31*, 127.
26. Sanghi, R.; Dixit, A.; Verma, P.; *Process Safety and Environ. Protect* **2011**, *89*, 15.
27. Zhang, F. M.; Knapp, J. S.; Tapley, K. N.; *Water Res.* **1999**, *33*, 129.
28. Corrêa, C. A. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil, 2009.
29. Ali, N.; Lutfullah, I. G.; Hameed, A.; Ahmed, S.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 1099.
30. Maliyekkal, S. M.; Rene, E. R.; Philip, L.; Swaminathan, T.; *J. Hazard. Mater.* **2004**, *109*, 201.
31. Radha, K. V.; Regupathi, I.; Arunagiri, A.; Murugesan, T.; *Process. Biochem.* **2005**, *40*, 3337.
32. Wanderley, C. R. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2007.
33. Michniewicz, A.; Ledakowicz, S.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; *Dyes Pigm.* **2008**, *77*, 295.
34. Assadi, M. M.; Jahangiri, M. R.; *Desalination* **2001**, *14*, 102.