

REVISTA AIDIS

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

USO DE FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA NA BIODEGRADAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL EM REATOR EM BATELADAS SEQUENCIAIS

Marcus Vinícius Freire Andrade¹
André Leite²
Helison de Oliveira Máximo²
Carlos Ronald Pessoa Wanderley²
Glória Maria Marinho Silva²
*Kelly Rodrigues²

USE OF WHITE ROT FUNGI IN BIODEGRADATION OF THE
TEXTILE DYE IN SEQUENCING BATCH REACTOR

Recibido el 6 de octubre de 2014; Aceptado el 25 de marzo de 2015

Abstract

Was evaluated the application of immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in removal of Congo Red (20 mg/L) in sequencing batch reactor, in cycles of 48 h, in the presence of glucose, added to the medium at concentrations of 5 g/L (Stage I) and 1 g/L (Step II). Removals were recorded averages 86% and 97% dye, respectively, in Stages I and II in relation to chromophore; and mean removal of organic matter from 56% (Stage I) and 76% (Stage II). There was formation of by-products and difficulty of rupture of the dye molecule, particularly, to a wavelength related to benzene, checking it if still greater production of manganese peroxidase enzyme in the presence of low concentration of glucose (1 g/L). Was obtained mean removal of 83% and 65% for ammonia and 74%, and 56% for nitrate, respective steps I and II. The fungi population on reactor was predominated in biofilm during the experiment, and was shown to be viable as the removal of color, being necessary the study of strategies that promote greater mineralization of the dye.

Key Words: co-substrate, ligninolytic enzymes, enzymatic inhibition, *Phanerochaete chrysosporium*, sequencing batch reactor, congo red.

¹ Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP), Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), 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

Foi avaliada a aplicação de biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium* na remoção de Vermelho do Congo (20 mg/L) em reator em bateladas sequenciais, em ciclos de 48 h, na presença de glicose, adicionada ao meio nas concentrações de 5 g/L (Etapa I) e 1 g/L (Etapa II). Registraram-se remoções médias de 86% e 97% de corante, respectivamente, nas Etapas I e II em relação ao cromóforo; e remoção média de matéria orgânica de 56% (Etapa I) e 76% (Etapa II). Houve formação de subprodutos e dificuldade de ruptura da molécula do corante, particularmente, no comprimento de onda referente ao benzeno, verificando-se ainda maior produção da enzima manganês-peroxidase na presença de concentração baixa de glicose (1 g/L). Foi obtida remoção média de 83% e 65% para amônia e 74%, e 56% para nitrato, respectivos às Etapas I e II. A população de fungos predominou no biofilme ao longo de todo o experimento e mostrou-se viável quanto à remoção de cor, sendo necessário o estudo de estratégias que promovam a maior mineralização do corante.

Palavras-chave: cossustrato, enzimas lignolíticas, inibição enzimática, *Phanerochaete chrysosporium*, reator em bateladas sequenciais, vermelho do congo.

Introdução

Os efluentes oriundos da atividade têxtil são muito difíceis de serem tratados, devido às variações na sua composição e pela presença de cores fortes que, se não eliminadas corretamente, acarretam sérios problemas ao meio ambiente. Além disso, alguns tipos de corantes, especialmente os do tipo azo e seus subprodutos, podem ser cancerígenos e mutagênicos (Souza *et al.*, 2010).

Mesmo que o lançamento de corantes no meio ambiente constitua apenas uma parcela da poluição da água, os mesmos são visíveis em pequenas quantidades, observando-se coloração do meio em concentrações de corante acima de 1 mg/L, ressaltando-se que normalmente estão presentes em efluentes em concentrações de 10 a 50 mg/L (Corso e Almeida, 2009).

Os corantes azo são compostos por um grupo $-N=N-$ que, quando ligados a moléculas, caracterizam os corantes diazo, monoazo ou poliazo. Atualmente, esta classe de corantes representa cerca de 60% do mercado mundial e são amplamente utilizados no tingimento de fibras têxteis (Souza *et al.*, 2010).

Devido à sua toxicidade, os corantes azo são ambientalmente perigosos e danosos à saúde humana, requerendo-se o tratamento de efluentes que os contenham. O tratamento biológico convencional de efluentes não é eficaz para a degradação de corantes e técnicas físicas são de alto custo, o que torna inviável sua aplicação em larga escala (Gomes *et al.*, 2009; Gopinath *et al.*, 2010). Neste contexto, a utilização de fungos é uma alternativa promissora de tratamento, em face a capacidade de mineralização de compostos poluentes através da ação de enzimas extracelulares não específicas com alto poder oxidativo (Bergsten-Torralba *et al.*, 2009).

Porém, a mineralização completa de corantes têxteis por via biológica representa um desafio, uma vez que se tem observado, na maioria das vezes, a ruptura da ligação azo, correspondente ao cromóforo, sem que haja degradação eficiente de outras estruturas componentes da molécula do corante, cuja presença pode exercer efeitos nocivos ao meio ambiente (Rodrigues *et al.*, 2011).

Dentro desta perspectiva, o objetivo desta pesquisa foi estudar a viabilidade de aplicação do fungo da podridão branca *Phanerochaete chrysosporium* visando à degradação do corante azo vermelho do congo e sua mineralização total, a partir da operação de reator biológico operado em regime de bateladas sequenciais.

Material e métodos

Cultivo do micro-organismo e produção de esporos

A espécie *Phanerochaete chrysosporium* foi cultivada em meio de cultura com composição adaptada de Andrade *et al.*, (2013) (g/L): Extrato de levedura (2), glicose (20), K₂HPO₄ (20), KH₂PO₄ (0.6), MgSO₄ (0.5) e peptona (2). Foram vertidos 20 mL de meio em placas de Petri, e, em seguida, procedeu-se a inoculação do fungo nas mesmas, mantendo-as posteriormente a 28°C, em estufa microbiológica, durante sete dias. Após este período, os esporos foram removidos com uso de solução salina (NaCl 0.89%), acrescida de *Tween* 80, sendo então transferidos para tubos de ensaio e então contados em câmara de Newbauer, com uso de microscópio óptico Opton – Bioval, com aumento em 40 vezes.

Imobilização do *Phanerochaete chrysosporium*

A espécie fúngica foi imobilizada em cubos de espuma de poliuretano, com 1 cm de aresta, os quais foram previamente esterilizados e colocados em redes de polietileno, perfazendo massa total de 5 g, e, em seguida, dentro de frascos Erlenmeyers contendo meio nutritivo com macro e micronutrientes, sendo realizada a adição dos esporos fúngicos na concentração de 2×10^6 esporos/mL. O meio nutritivo utilizado para a imobilização foi composto por (g/L): glicose (5); NaNO₃ (0.25); MgSO₄ · 7H₂O (1); CaCl₂ · H₂O (0.04); (NH₄)₂SO₄ (0.5); KH₂PO₄ (2); H₂MoO₄ (0.02); MnSO₄ (0.02); Fe₂(SO₄)₃ (0.02) e ZnSO₄ · 7H₂O (0.01).

Os frascos Erlenmeyers foram mantidos sob agitação por 48 horas, em temperatura de 30°C, em mesa agitadora a 150 min⁻¹, e, após esse intervalo, foi trocado e mantido nas mesmas condições por mais 72 h para ocorrer o crescimento da biomassa por todo o suporte. Em seguida, a biomassa imobilizada foi lavada utilizando água destilada esterilizada a 120°C por 15 minutos e então transferida para o reator.

Alimentação do Reator

Para a alimentação do reator foi preparada água residuária no laboratório, a qual consistia de meio basal - baseado em Andrade *et al.* (2013) e Fountoulakis *et al.* (2002) -, adicionada de 20 mg/L de Vermelho do Congo (VETEC® P.A.), apresentando a seguinte composição (g/L): KH_2PO_4 (0.2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2). Foram adicionados ainda 10 mL/L de solução de micronutrientes, a qual era composta por (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3.0), NaCl (1.0), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.082), H_3BO_3 (0.01), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01).

A definição da concentração de corante utilizada neste estudo teve por base um efluente *in natura* de uma indústria têxtil, localizada no distrito industrial de Maracanaú, no Ceará – Brasil. A água utilizada para o preparo da água residuária sintética era oriunda da rede de abastecimento local e após a adição dos sais, a mesma era submetida a autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Após este procedimento, com a água residuária em temperatura ambiente, o corante era adicionado e o pH inicial do meio ajustado entre 5 e 5,5, com adição de ácido sulfúrico 5 mol/L, a fim de manter condições mais apropriadas para o desenvolvimento dos fungos (Griffin, 1994).

Operação do Reator em Bateladas Sequenciais (RBS)

A operação do reator compreendeu duas etapas operacionais, caracterizadas pela variação da concentração de cossustrato adicionado ao meio: Etapa 1 (5 g/L de glicose) e Etapa 2 (1 g/L de glicose). As concentrações de glicose foram definidas com base em estudos preliminares a partir dos trabalhos de Lopes *et al.* (2011) e Rodrigues *et al.* (2011).

O reator, confeccionado em vidro, possuindo volume reacional de 4 L e operado em ciclos de quarenta e oito horas, perfazendo em cada etapa 20 ciclos. Assim, ao final de cada um dos ciclos monitorados, obteve-se eficiência de remoção de corante, matéria orgânica e de nitrogênio em relação à concentração afluente. Deste modo, os 20 dados de remoção gerados nos ciclos da Etapa 1 foram comparados com os 20 dados de remoção obtidos na Etapa 2 para cada uma das variáveis mencionadas por meio de análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey para efeito de comparação dos resultados e obtenção de parâmetro estatístico. As leituras foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

A operação do reator em bateladas sequenciais abrangeu período total de 179 dias, perfazendo 74 dias para Etapa I (5 g de glicose/L), e 105 dias para Etapa II (1 g de glicose/L). Houve introdução de oxigênio ao reator promovido por uso de micro-compressores de ar. O reator foi operado sob temperatura ambiente, a um valor médio de $\pm 30^\circ\text{C}$, em condições não controladas de temperatura, simulando sua atividade em situação próxima do real que é encontrada nas estações de tratamento de esgoto.

Caracterização e Acompanhamento Analítico do RBS

As análises físico-químicas realizadas foram corante, demanda química de oxigênio (DQO) dissolvida – medida na amostra filtrada em membrana de porosidade de $0.47 \mu\text{m}$ –, pH, amônia e nitrato, todas executadas segundo metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* APHA (2005), exceto a determinação da enzima *manganês peroxidase*, realizada de acordo com Aguiar Filho (2008), e a concentração de corante que foi de acordo com Rodrigues *et al.* (2011).

Na determinação enzimática foram utilizados tubos de ensaios, para amostras fervidas e amostras não fervidas, adicionado em cada tubo $50 \mu\text{L}$ de MnSO_4 , $50 \mu\text{L}$ de H_2O_2 em tampão succinato, $100 \mu\text{L}$ de lactato de sódio, $200 \mu\text{L}$ de albumina bovina e $600 \mu\text{L}$ de amostra. Em seguida, os tubos foram fervidos por 10 minutos (controle), retirados e resfriados. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adicionou $100 \mu\text{L}$ de vermelho de fenol. Depois de 10 minutos, o tempo final foi determinado com a medida da absorbância após adição de $40 \mu\text{L}$ de NaOH. As amostras e os controles foram medidos a 610 nm . Para o cálculo da atividade da enzima foi utilizada a Equação 1, sendo Δabs é a variação da absorbância, ϵ é o coeficiente de absorção molar ($\epsilon_{610\text{nm}} = 44600 \text{ L/M.cm}$), R é a quantidade de solução da amostra (mL) e t é o tempo de reação em minutos. UI/L é a unidade internacional, que significa $\mu\text{mol/min}$. Considerou-se caminho óptico de 1 centímetro.

$$\text{UI/L} = \frac{\Delta\text{abs.}}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6 \quad \text{(Equação 1)}$$

Para a medida da com concentração de corante, estabeleceu-se relação entre a absorbância e o equivalente em termos de concentração de corante, construindo-se curva de calibração na qual foram utilizadas soluções de concentrações conhecidas do corante, variando de 0 (branco) a 30 mg L^{-1} , sendo que, antes da leitura em comprimento de onda 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.

Contagem de micro-organismos na água residuária

A contagem de micro-organismos foi feita com procedimento de diluição em série e plaqueamento em meio seletivo de Martin para fungos e meio Nutriente - Ágar para bactérias heterotróficas, conforme descrito por Costa *et al.*, (2010). Para ambos os plaqueamentos misturou-se 10 mL de água residuária em 90 mL de solução salina ($\text{NaCl } 0.89\%$) em agitação em vórtex, por 5 min. Alíquotas de 1 mL foram retiradas e transferidas para 9 mL de solução salina.

Novamente, alíquota de 1 mL foi retirada e transferida para 9 mL de solução salina e assim sucessivamente até obter-se diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Em seguida, as diluições foram plaqueadas no meio seletivo de Martin e Nutriente – Ágar através da técnica de *spread – plate*.

Ensaio de adsorção do corante no biofilme

No último ciclo de cada uma das etapas estudadas foram retiradas do reator amostra de 0.5 g de espuma e transferidas para frascos *Erlenmeyer* contendo solução salina (0.89% NaCl) e pérolas de vidro, procedendo-se à agitação para propiciar a remoção da biomassa imobilizada no suporte.

O líquido resultante foi centrifugado e o sobrenadante descartado. A biomassa foi utilizada para extração de corante adsorvido, utilizando 10 mL de metanol como solvente, transferindo-se este volume juntamente com a biomassa para tubos de vidro, onde a mesma permaneceu em contato durante 10 minutos, em regime estático. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de metanol, e o meio homogeneizado em agitador tipo vórtex. A leitura da concentração de corante no líquido correu em espectrofotométrica à 500 nm, conforme Cripps *et al.*, (1990).

Ensaio de adsorção do corante no meio suporte

O ensaio de adsorção para verificar a capacidade máxima do material suporte de adsorver o corante foi realizado a parte, tendo-se empregado frasco de vidro de 4 L, ao qual foram adicionados 5 g de espuma de poliuretano - previamente secas em estufa - e 1 L do meio mineral acrescido de 0.05 g/L de corante Vermelho do Congo. Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo até o tempo de saturação do material suporte que é de 24 h, conforme Silva (2012), quando todos os sítios do adsorvente se ligam ao adsorvato (corante), estabilizando a concentração de corante presente no meio aquoso. Os tempos de retirada de alíquotas para o ensaio de adsorção foram de (h): 0; 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 15 e 24. Então, procedeu-se à determinação da concentração de corante no meio, sendo a capacidade máxima de adsorção do corante na espuma monitorada a partir da saturação do referido material suporte em relação à concentração de corante no meio.

Resultados e discussões

Na Tabela 1 são apresentados os valores referentes às características do afluente em relação às variáveis determinadas. Apesar de se tratar de água residuária sintética, a concentração de corante afluente oscilou entre 13 mg/L e 23 mg/L, na Etapa I, e de 8 mg/L e 18 mg/L, na Etapa II, o que foi atribuído ao preparo manual da mesma. Em relação à matéria orgânica, em termos de DQO, o maior valor registrado na Etapa II decorre da maior adição de glicose no meio na referida etapa.

Tabela 1. Características da água residuária no afluente ao reator nos ciclos operacionais das Etapas I e II

Parâmetro	No. de provas		Valor Médio \pm Desvio Padrão	
	Etapa I	Etapa II	5 g/L	1 g/L
			Etapa I	Etapa II
pH			4.3 \pm 0,4	4 \pm 0.54
Corante (mg/L)	20	20	18 \pm 5	13 \pm 5
Amônia (mg/L)			99 \pm 28	77 \pm 25
DQO (mg/L)			3336 \pm 1000	923 \pm 204

O reator em batelada foi eficiente quanto à remoção de corante, alcançando percentuais médios de remoção correspondentes a 86% e 97% para as Etapas I e II, respectivamente, indicando que a maior concentração de cossubstrato não propiciou maior eficiência de remoção de corante, visto que na Etapa II, quando foi adicionada a menor concentração de glicose (1g/L), foram atingidos os maiores percentuais de remoção.

Embora os dois ciclos iniciais da Etapa I tenham apresentado 100% de remoção de corante, esta remoção, provavelmente, foi fortemente influenciada pela adsorção inicial do corante ao micélio e ao meio suporte, conforme Cripps *et al.* (1990). Logo após estes ciclos, as remoções percentuais se mantiveram entre 69% e 99%.

Na Etapa II, o reator em batelada alcançou remoções de corante entre 81% (16^o ciclo) e 99.8%, observando-se remoção máxima em 10 dos 20 ciclos operacionais desta etapa, com remoção média de corante de 97%. O perfil apresentado pelo reator quanto à variação da concentração de corante (Figura 1) mostrou que o fungo foi hábil na redução da concentração de corante, o que estaria relacionado à sua prévia adaptação à fase anterior com glicose, na concentração de 5 g/L.

Ao se confrontar os dados de remoção de corante das duas etapas através da análise estatística ANOVA, verificou-se que na Etapa II houve melhor desempenho quanto à remoção de corante Vermelho do Congo, o que foi endossado pelo percentual médio de remoção (97%). Sendo assim, a adição de glicose em uma maior concentração, 5 g/L, não foi fator determinante para o aumento da eficiência do processo de remoção do corante pelo sistema.

Pant *et al.* (2008) empregaram o fungo *Phanerochaete chrysosporium* para remoção de Vermelho do Congo (15 mg/L) em meio sintético em reatores em batelada sob agitação à 150 min⁻¹. Os autores obtiveram 88.8% de remoção de corante, em quinze dias de operação, na presença de 5 g de glicose/L, sendo utilizada ureia como fonte de nitrogênio.

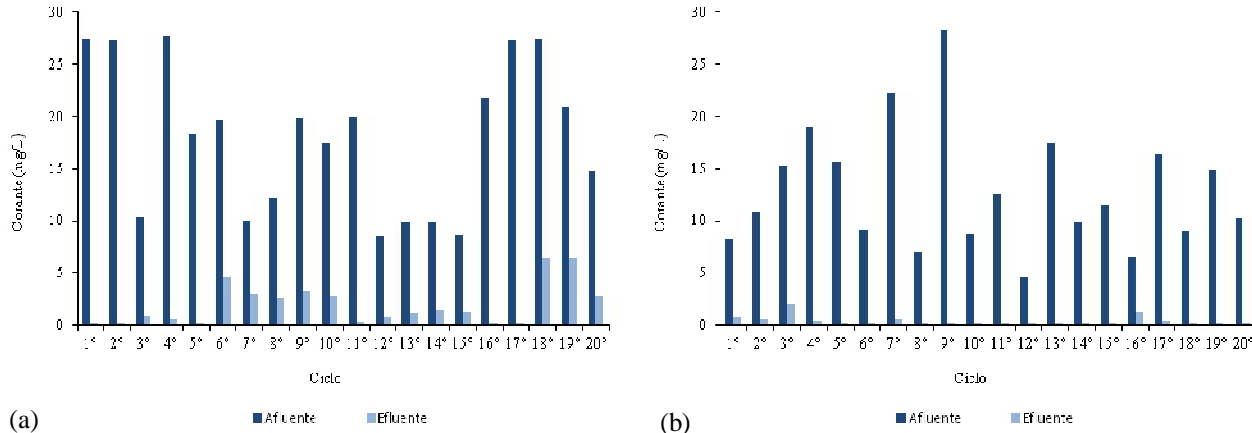


Figura 1. Variação da concentração de corante no afluente e efluente dos ciclos operacionais nas Etapas I (a) e II (b), no reator RBS com biomassa fúngica imobilizada.

Semelhantemente a Pant *et al.* (2008), na presente pesquisa foram obtidos percentuais médios de remoção de corante de 97%, utilizando concentração menor de glicose (1 g/L) e em menor período de tempo (48 horas), o que possivelmente pode ter ocorrido pela configuração do reator, no qual a biomassa encontrava-se imobilizada, fato este que otimizou o processo de degradação por estarem os micro-organismos já adaptados ao meio e formarem biofilme que lhes garante maior resistência a fatores negativos ao processo, proporcionando tempo de retenção celular superior ao tempo de reação ou tempo de ciclo.

No ensaio de adsorção, a concentração de corante no meio ficou estável de 18 horas até 24 horas, sofreu alteração e permaneceu constante, revelando que a espuma de poliuretano foi capaz de adsorver 4 mg de Vermelho do Congo/g. Além disso, na biomassa, ao final do experimento, constatou-se que a massa de corante adsorvido era de 79.6 mg, o que resultou em massa total de corante adsorvido no interior do reator, no suporte e na biomassa, de 420 mg.

Como ao longo da operação do reator foram removidos 1157.5 mg de corante, descontando-se a parcela referente à massa de corante adsorvido (420 mg), estima-se que foram removidos biologicamente 737.5 mg de Vermelho do Congo ao longo da operação do reator, constituindo-se a ação biológica a principal via de remoção do poluente.

Na Figura 2 é mostrada a varredura efetuada para amostras afluentes e efluentes do reator em ambas as Etapas.

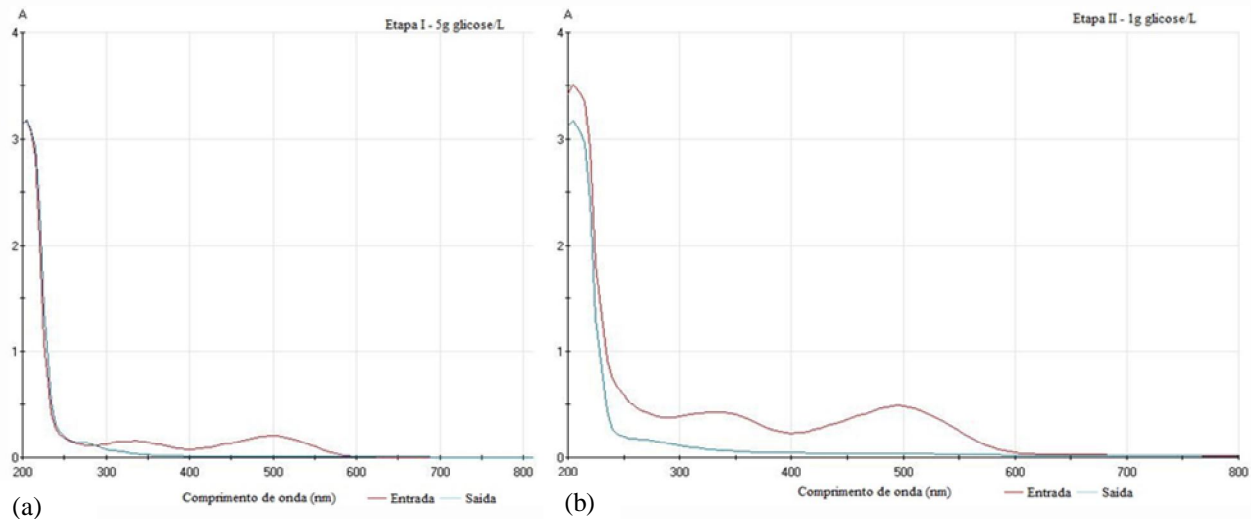


Figura 2. Varredura do corante Vermelho do Congo durante a operação do reator RBS, 10º ciclo das Etapas I (a) e II (b), no reator RBS com biomassa fúngica imobilizada.

É importante ressaltar que a degradação do corante foi parcial, ainda que o efluente tenha se apresentado muito clarificado, pois o detalhamento espectroscópico das bandas de absorção em amostras afluentes e efluentes do reator, após os ciclos de cada etapa finalizada, mostrou que houve remoção de corante no comprimento de onda relativo ao cromóforo (λ 500 nm), mas comportamento diferente quanto à diminuição do valor de absorbância nos comprimentos de onda relativos ao benzeno (λ 233 nm) e ao naftaleno (λ 345 nm).

Conforme relatado nos trabalhos de Oturkar *et al.* (2013) e Almeida e Corso (2014), a mineralização da molécula implica na diminuição total da banda espectrofotométrica do efluente em relação ao afluente também no comprimento de onda equivalente às estruturas benzeno (λ 233 nm) e naftaleno (λ 345 nm), tal como ocorreu no comprimento de onda relativo à posição do cromóforo (λ 500 nm). Como a diminuição da banda só foi visualizada no comprimento de onda do cromóforo, há indícios de que houve a ruptura da molécula do corante na ligação do cromóforo, de modo que teriam sido produzidos subprodutos no efluente dos ciclos operacionais.

Durante a Etapa I, quando se dispunha de maior concentração de glicose, não foi registrada diminuição das bandas no comprimento de onda para os compostos aromáticos benzeno e naftaleno.

Na Etapa II, houve diminuição da banda cromóforo (98%) e dos anéis benzeno (10%) e naftaleno (75%), mostrando que a utilização da molécula do corante pelos micro-organismos foi parcial, com maior dificuldade na remoção da estrutura relativa ao benzeno. Contudo, é importante ressaltar que estruturas aromáticas como benzeno, embora sejam pouco reativas, devido a sua estabilidade molecular, são passíveis de degradação biológica, conforme relatado por Hassan e Sorial (2009), o que ocorre particularmente sob condições ácidas – como observado nesta pesquisa, cujo pH ficou em torno de 3, tanto na Etapa I quanto na II –, e envolvendo a produção de radicais OH⁻ em ambiente aeróbio, com geração do intermediário catecol (Aranda *et al.*, 2010). Desta forma, a presença de compostos decorrentes da utilização parcial da molécula de Vermelho do Congo ficou refletida ainda na eficiência de remoção de matéria orgânica, em termos de DQO solúvel, sendo que na Etapa II, quando houve a maior remoção de corante nos comprimentos de onda investigados, foi registrado o maior percentual de remoção de matéria orgânica (77%).

Na Etapa I, quando não houve diminuição do comprimento de onda relativo ao benzeno e ao naftaleno, a remoção média de matéria orgânica solúvel foi menor, de 55%, com percentuais variando de 17% a 77% e apresentando grande oscilação nos mesmos, ao longo dos ciclos operacionais estudados, o que pode ser justificado ainda pela alta disponibilidade de glicose, que sendo material orgânico facilmente oxidável, constituiu parcela considerável da DQO.

Ainda durante a Etapa I, verificou-se visualmente o maior crescimento de biomassa fúngica, com formação de biofilme espesso, constituindo uma camada grossa microbiana, cujo crescimento foi propiciado pela grande disponibilidade de glicose no meio, a qual foi adicionada em concentração elevada (5 g/L).

O crescimento excessivo do biofilme na referida etapa teria resultado na limitação difusional de nutrientes, uma vez que haveria maior dificuldade do fluxo de nutrientes chegar às camadas mais internas do biofilme, tendo como consequência o desprendimento de parte de sua estrutura devido à morte das células localizadas mais internamente.

Outro aspecto a ser considerado é que a adição da glicose em concentração elevada (5 g/L) pode ter resultado também na repressão de metabolismo microbiano, pois, conforme relatado por Santos *et al.*, (2008), o excesso de glicose pode inibir a produção de enzimas destinadas à degradação de poluentes. Assim, como foi encontrada no meio disponibilidade elevada de fonte de carbono de fácil assimilação (glicose), não há necessidade de utilizar fontes mais complexas, causando menor utilização de outras fontes de carbono mais complexas ou mesmo inibindo seu uso, o que ratificaria os percentuais mais baixos de remoção de corante obtidos nesta etapa, sobretudo no 7^o (69.6%) e 19^o (68.9%) ciclos.

Na Etapa II, quando ocorreu a maior remoção média de matéria orgânica (75%), também houve maior homogeneidade nos percentuais de remoção de DQO, os quais oscilaram de 32% a 96% (Figura 3). O desempenho do reator nesta etapa foi considerado bom, visto que em uma menor disponibilidade de glicose, os micro-organismos removeram melhor a parcela orgânica presente no meio, relativa à molécula do corante e de possíveis subprodutos de sua degradação.

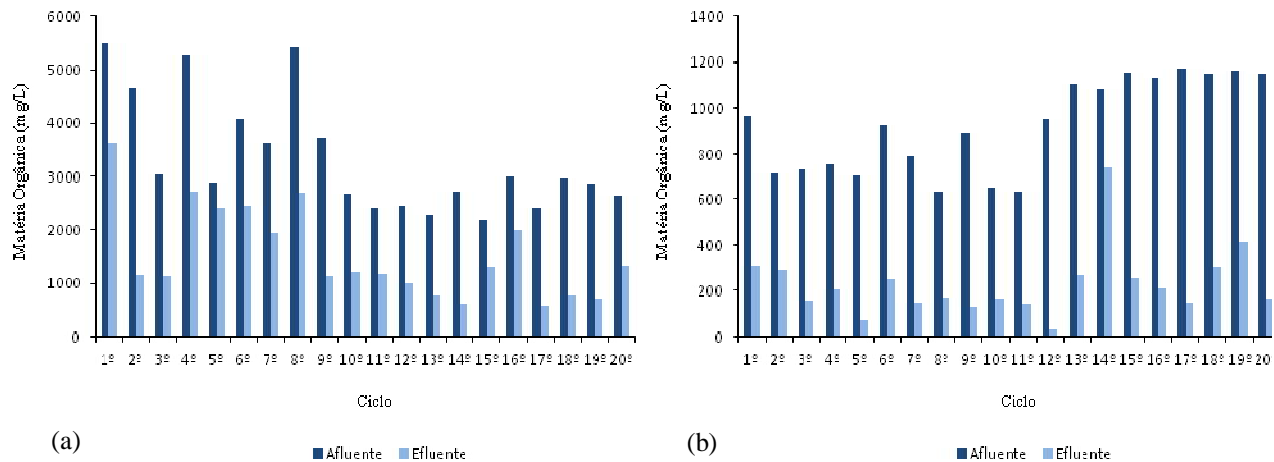


Figura 3. Variação da concentração de matéria orgânica solúvel, em termos de DQO, no afluente (entrada) e efluente (saída) dos ciclos operacionais para as Etapas I (a) e II (b), no reator RBS, com biomassa fúngica imobilizada.

A análise estatística através do ANOVA identificou que houve diferenças significativas nos percentuais de remoção de corante da Etapa I e Etapa II ($p < 0.0036$), corroborando no fato de que as condições operacionais na Etapa II contribuíram para uma maior eficiência na remoção de DQO, assim como em corante.

Em respeito à variação de pH no meio, durante todas as etapas de estudo foi observada manutenção de valores baixos característicos de meio ácido, com pH médio de 3.0 (Etapa I) e de 3.2 (Etapa II), o que pode resultar da presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, gerados a partir da degradação da molécula do corante e da glicose.

O uso da glicose, favorece a formação de subprodutos oriundos de sua utilização e de outras moléculas que são utilizadas como substrato pelos fungos, gerando ácidos orgânicos, e que ocasiona decréscimo nos valores de pH, justificando os valores encontrados (Rodrigues *et al.*, 2007).

Os dados pertinentes à fração nitrogenada, representada por amônia e nitrato, revelaram que houve considerável remoção destas. O *Phanerochaete chrysosporium* tem seu metabolismo influenciado pela concentração de nitrogênio no meio, sendo o nitrogênio oriundo do sulfato de amônio (0.2 g/L) e da molécula de corante.

Diferentemente das bactérias, os fungos não realizam nitrificação, tendo a capacidade de assimilar amônio, incorporando-o ao seu material celular em reações de síntese de aminoácidos (Griffin, 1994), sendo que muitas espécies de fungos como o *Phanerochaete chrysosporium* têm a capacidade de realizar redução desassimilatória do nitrato, onde o mesmo é convertido a nitrito e este à amônio mediante a ação de enzimas específicas – *nitrato e nitrito reductase* – para futura assimilação.

Para amônia, ocorreram remoções médias de 83%, e 65% nas Etapas I e II, respectivamente. Durante a Etapa I houve remoção mínima de 45% e remoção máxima de 99%. Já para Etapa II, houve remoção mínima de 19% e máxima de 98%.

Os percentuais de remoção de amônia durante as Etapas analisados pela ferramenta estatística ANOVA mostraram que a Etapas I comparada a Etapa II, exibiu diferenças significativas ($p < 0.0005$), com as maiores remoções na Etapa I, ou seja, na presença de maior concentração de glicose, semelhantemente ao relatado por Lopes *et al.*, (2011) que trabalharam com reator em bateladas sequenciais inoculado com *Aspergillus niger* para remoção de fenol em efluente industrial de beneficiamento da castanha de caju. Ao utilizarem 1 g/L de glicose como cossubstrato, os autores obtiveram remoção média percentual de amônia em 50%, percentual este que foi inferior ao registrado quando houve o aumento da concentração disponível de glicose para 5 g/L, o qual foi de 89%.

Papagianni *et al.* (2005) afirmaram que íons amônio, armazenados no interior da célula fúngica, reagem com a glicose para formar glucosamina, composto de reserva utilizado pelos fungos, liberando H^+ para o meio. Assim, a melhor eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal registrada na Etapa I deve estar relacionada à maior disponibilidade de glicose para a formação da glucosamina, o que teria favorecido a obtenção de maiores percentuais de remoção.

Já em relação ao nitrato, as remoções percentuais médias alcançadas foram de 74% e 56% para as Etapas I e II, respectivamente. Os percentuais de remoção variaram, na Etapa I, entre 24% e 69%, e, na Etapa II, entre 8% e 78%. Vale ressaltar que, durante a Etapa II, houve dois ciclos de acúmulo de nitrato no meio, ciclos 25° e 26°. A análise dos dados de remoção através do ANOVA mostrou que a presença de maior concentração de glicose tendeu a aumentar a remoção percentual de nitrato, com diferenças significativas entre as Etapas I e II ($p < 0.0034$).

No processo em questão a ação sobre o substrato (fontes de carbono) ocorre pela ação de micro-organismos que se encontram no interior do reator, imobilizados em material suporte, formando um biofilme, o qual está o tempo todo em contato com o substrato, uma vez que ao término de um ciclo, logo se iniciava um novo ciclo. Assim, para quebrar as moléculas que pretende absorver, os micro-organismos produzem as enzimas, de modo que por estarem confinados no interior do reator, exerceram atividade enzimática de forma ao longo de todo o tempo operacional do reator, nos ciclos que se sucederam, e de forma intensa (Li *et al.*, 2015) pois tinham a sua disposição fonte de carbono a consumir.

A análise da atividade da enzima *manganês peroxidase* mostrou que esta foi produzida nas concentrações de 0.8 a 8.1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ para a Etapa I, porém sua maior produção foi na Etapa II, com concentrações de 0.8 a 32.3 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Os maiores picos de atividade enzimática, observados tanto na Etapas I quanto na II (Figura 4), corresponderam aos melhores percentuais de remoção de corante registrados nas mesmas, o que sugere a existência de relação entre a ação enzimática de *manganês peroxidase* e a remoção de corante. A análise do nível de significância dos dados experimentais obtidos pela ANOVA indicou ter ocorrido diferença estatística ($p < 0.05$) entre as Etapas I e II para esta variável, de modo que houve efetivamente maior produção enzimática quando a glicose, fonte primária de carbono, estava presente em menor concentração (1 g/L).

Zhou *et al.*, (2007) afirmaram que a disponibilidade elevada de uma fonte primária de carbono como a glicose para o micro-organismo pode ocasionar variações na liberação de enzimas, o que é desvantajoso, pois quando a concentração de matéria orgânica de fácil biodegradação é elevada pode ocorrer diminuição do rendimento enzimático. A afirmação dos autores endossou o baixo perfil de liberação da enzima durante a Etapa I (5 g de glicose/L), onde a atividade média registrada para essa enzima foi de 3.6 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

Por outro lado, Buswell *et al.* (1995) afirmaram que fontes de carbono de maior complexidade, como o corante empregado, têm a capacidade de estimular a produção de enzimas, o que também foi ratificado por Leung e Poiting (2002). Tal fato explicaria as diferenças estatísticas existentes para a produção de enzima entre as Etapas 1 e 2, sugerindo assim, a influência da concentração de glicose – cossubstrato utilizado – sobre a produção e liberação de enzimas extracelulares.

É importante mencionar que as enzimas se encontravam presentes no meio aquoso, no interior do reator, e que, nas concentrações nas quais estavam presentes, não poderiam contribuir massivamente com o aumento da concentração de matéria orgânica dissolvida, de modo que as concentração traço foram suficiente para favorecer a ruptura do corante, sendo este assimilado do meio, o que ficou refletido nos percentuais elevados de DQO solúvel.

Na Tabela 2 é apresentado um resumo com as concentrações médias observadas no efluente no final dos ciclos operacionais para as Etapas I e II para as variáveis pH, corante, amônia e DQO.

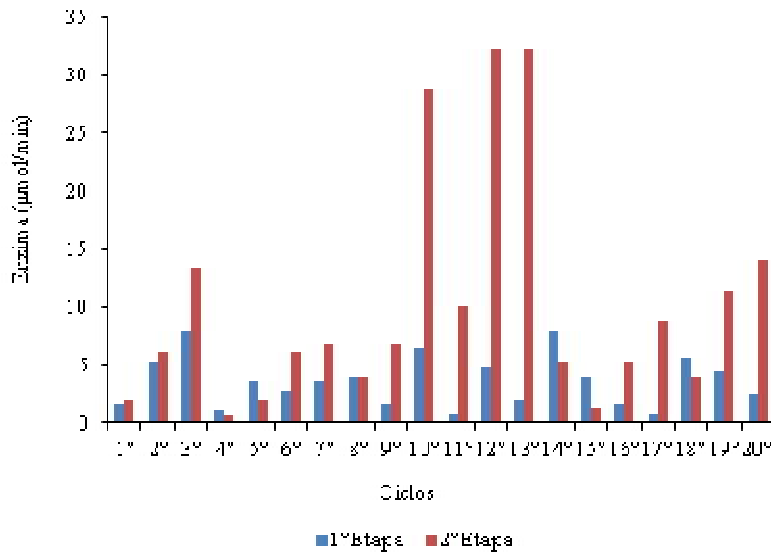


Figura 4. Variação da atividade enzimática no final dos ciclos operacionais, no reator RBS com biomassa fúngica imobilizada, para as Etapas I e II.

Tabela 2. Concentrações médias observadas no efluente no final dos ciclos operacionais para as Etapas I e II para as variáveis pH, corante, amônia e DQO

Parâmetro analítico	Valor Médio ± Desvio Padrão	
	5g/L	1g/L
pH	3 ± 0.5	3.1 ± 0.7
Corante (mg/L)	2.4 ± 2	0.3 ± 0.6
Amônia (mg/L)	17 ± 12	27 ± 17
DQO (mg/L)	1536 ± 849	229 ± 150

Ao final das Etapa I e II, foi realizada contagem das colônias de fungos e bactérias heterotróficas, a qual revelou a predominância do fungo *Phanerochaete chrysosporium* no biofilme do reator durante sua operação. Na Tabela 3 está exibida a concentração de micro-organismo como Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL).

Tabela 3.Contagem de micro-organismos ao final de cada Etapa

Micro-organismos (UFC/mL)	1º Etapa	2º Etapa
Fungos	8×10^5	6×10^4
Bactérias	3×10^2	5×10^3

O maior número de colônias de *Phanerochaete chrysosporium* indicou que este micro-organismo conseguiu se estabelecer no biofilme utilizando a glicose e o corante como fontes de carbono, o que resultou em seu maior crescimento, tal como também reportado por Lu *et al.*, (2009) que estudaram a remoção de cor de efluente têxtil por fungos sob condições não estéreis, tendo observado que os fungos predominaram no reator em relação às bactérias, particularmente quando da menor concentração de glicose (0.5 g/L).

Na presente pesquisa, curiosamente, quando da menor concentração de glicose (1 g/L), houve ligeira diminuição da população de fungos em relação a etapa anterior, porém continuaram sendo a população dominante no interior do reator.

Conclusão

A adição de glicose como cossustrato, nas condições estudadas, favoreceu a produção de efluente final clarificado, observando-se a degradação de Vermelho do Congo pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, ainda que parcialmente devido à formação de subprodutos que ainda permaneceram no meio, particularmente de benzeno.

Durante todas as etapas estudadas houve boa remoção de matéria orgânica, expressa em termos de DQO. Houve manutenção nos valores de pH sendo estes característicos de meio ácido e a remoção simultânea de amônia e nitrato tanto na Etapa I quanto na II. Contudo, os maiores percentuais de remoção de nitrogênio foram obtidos na Etapa I, quando o reator foi operado com maior concentração de glicose.

A enzima MnP teve atividade registrada durante todas as Etapas I e II, tendo sua produção influenciada pela concentração de glicose, a qual reprimiu a produção da enzima quando presente no meio em concentração elevada (5 g/L), sugerindo que a melhor concentração de glicose a ser empregada no processo foi a de 1 g/L visando à biodegradação do corante. Porém, maiores estudos precisam ser feitos buscando alcançar maior mineralização do poluente e sobretudo dos subprodutos formados, particularmente, do benzeno.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Deus e ao Conselho Nacional de Tecnologia e Desenvolvimento Científico (CNPq), órgão de fomento à pesquisa no Brasil, pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- Almeida, E.J.R., Corso, C.R. (2014) Comparative study of toxicity of azo dye procion red mx-5b following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere*, **112**, 317-322.
- Aranda, E., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2010) Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation*, **21**, 267-281.
- Aguiar, Filho, J.M.M. (2008) *Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana de açúcar*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – São Paulo, 75pp.
- APHA, American Public Health Association (2005) *Standard methods for water and wastewater examination*, 21th ed., APHA, Washington, DC, USA, 1496pp.
- Andrade, M.V.F., Silva, K.M.L., Siqueira, J.P.S., Wanderley Pessoa, C.R., Araújo, R.S., Marinho, G., Rodrigues, K. (2013) Azo dye degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in the medium enriched with nitrogen in the presence of primary co-substrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**(5), 867-874. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v56n5/19.pdf>
- Bergsten-Torralba, L.R., Nishikawa, M.M., Baptista, D.F., Magalhães, D.P., Da Silva, M. (2009) Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**, 808-817. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v40n4/v40n4a11.pdf>
- Buswell, J.A., Cai, Y., Chang, S. (1995) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, **12**, 81-88.
- Costa, L., Dellamatrice, P., Sousa, M. Silva, G.M.M. (2012) Biorremediação de uma área contaminada com o inseticida metamidofós por *Corynebacterium* sp. *Conex. Ci. e Tecnol.*, **4**(1), 17-23. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://conexoes.ifce.edu.br/index.php/conexoes/article/view/358/268>
- Corso, C.R., Almeida, A.C.M. (2009) Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*. *Microb. Ecol.*, **57**, 384-390.
- Cripps, C., Bumpus, J.A., Aust, S.D. (1999) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(4), 1118-1128.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G. (2002) Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, **36**, 4735-4744.
- Gomes, E., Aguiar, A.P., Carvalho, C.C., Bonfa, M.R.B., Silva, R., Boscolo, M. (2009) Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulose agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Braz. J. Microbiol.*, **40**, 31-39. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v40n1/a05v40n1.pdf>
- Gopinath, K.P., Muthukumar, K., Velan, M. (2010) Sonochemical degradation of Congo red: Optimization through response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, **157**, 427-433.
- Griffin, D.H. (1994) *Fungal physiology*, 2nd ed, New York, Wiley-Liss, 458pp.
- Hassan, A.A., Sorial, G. (2009) Biological treatment of benzene in a controlled trickle bed air biofilter. *Chemosphere*, **10**(75), 1315-1321.
- Leung, P.C., Pointing, S.B. (2002) Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly R decolorization by white-rot fungi. *Mycological Research*, **106**, 86-92.

- Lopes, M.S.S., Oliveira, P.C.C., Andrade, M.V.F., Araújo, R.S., Marinho, G., Rodrigues, K.A. (2011) Removal of macronutrients from effluent of a cashew nut industry by using a batch aerobic reactor with fungal inoculums. *Eng. Sanit. Ambient*, **16**(1), 17-26. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v16n1/a05v16n1.pdf>
- Li, X., Zhao, G., Yuan, Y. (2005) A strategy of phosphorous feeding for repeated fed – batch fermentation of penicillin G. *Biochemical Engineering Journal*, **27**, 53-58.
- Lu, Z., Sun, X., Yang, Q., Li, H., Li, C. (2009) Persistence and functions of a decolorizing fungal consortium in a non-sterile biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal*, **46**, 73-78.
- Oturkar, C.C., Patole, M.S., Gawai K.R., Madamwar, D. (2013) Enzyme based cleavage strategy of *Bacillus lentus* B1377 in response to metabolism of azoic recalcitrante. *Bioresource Thecnology*, **130**, 360-365.
- Papagianni, M., Wayman, F.M., Mattey, M. (2005) Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Environmental Microbiology*, **71**(11), 7178-7186.
- Pant, D., Singh, A., Satyawali, Y., Gupta, R.K. (2008) Effect of carbon and nitrogen source amendment on synthetic dyes decolourizing efficiency of white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Environmental Biology*, **29**(1), 79-84.
- Rodrigues, K.A., Sampaio, G.M.M.S., Zaiat, M., Santaella, S.T. (2007) Influência da glicose no consumo de fenol por *Aspergillus niger* AN 400 de meio sintético em reatores em batelada. *Eng. Sanit. Ambient*, **12**, 380-386. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v12n2/a13v12n2.pdf>
- Rodrigues, K., Lima, K.M., Silva, G.M., Silva, G., Cunha, P., Pessoa, R. (2011) Remoção de corante por uso de *Aspergillus niger* AN400 em reator em bateladas sequenciais. *Quím. Nova*, **34**(7), 1119-1123. Acesso em 6 de julho de 2015, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n7/v34n7a03.pdf>
- Santos, V.L., Monteiro, A.S., Braga D.T., Santoro, M.M. (2008) Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* E13 isolated from industrial effluents. *J. Hazard Mater*, **30**, 161-168.
- Souza, S.M.A.G., Bonilla, K.A.S., Ulson de Souza, A.A. (2010) Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. *J. Hazard Mater*, **179**, 35-42.
- Zhou, X., Wen, X., Feng, Y. (2007) Influence of glucose feeding on the ligninolytic enzyme production of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, **1**, 89-94.