

## Artigo Técnico

# Estudo da descoloração do corante FD&C azul no 2 Indigotina pelo tratamento combinado do fungo *Trametes versicolor* e processo de filtração lenta

*Study of decolorization of FD&C blue # 2 indigotine by fungus *Trametes versicolor* combined with slow sand filtration*

Maria Margareth Gonçalves Lopes<sup>1</sup>, Paulo de Tarso Ferreira Sales<sup>1</sup>, Luiza Cintra Campos<sup>2</sup>, Fernando Schimidt<sup>3</sup>, Mariângela Fontes Santiago<sup>4</sup>

## RESUMO

O uso de fungos na descoloração de corantes com métodos economicamente viáveis de produção de água bacteriologicamente segura há muito vem sendo descrito por diversos autores. Este trabalho teve por objetivo investigar a eficiência da remoção de corante artificial FD&C azul nº 2 Indigotina, com uso do fungo de degradação branca *Trametes versicolor* em combinação com a filtração lenta. Para a realização dos trabalhos, foram instalados dois protótipos de filtros lentos denominados FL-A e FL-B – no sobrenadante do filtro FL-A foi inoculado o referido fungo, e o filtro FL-B foi utilizado como controle (sem inoculação do microrganismo). O melhor percentual de remoção do corante pelo fungo *Trametes versicolor* em combinação com a filtração lenta foi de 44,74% 24 horas após a atividade máxima registrada de lacase. Os resultados mostraram que a filtração lenta combinada com o tratamento com o fungo *T. versicolor* não apresenta grande potencial para remoção de cor em 21 dias de tratamento, visto que os produtos microbianos gerados interferem no processo de filtração, diminuindo a eficiência do processo físico. Entretanto, restringindo o tempo de tratamento a 24 horas após a atividade enzimática máxima, o tratamento combinado apresentou boa eficiência.

**Palavras-chave:** descoloração; filtração lenta; corante; *Trametes versicolor*.

## ABSTRACT

The use of fungi in the decolorization of dyes with economically viable methods of producing bacteriologically safe water has long been described by several authors. This study aimed to investigate the removal efficiency of artificial coloring FD&C Blue nº 2 Indigo, using the degradation white fungus *Trametes versicolor* in combination with slow sand filtration. Two prototype filters slowly termed FL-A and FL-B were installed – the supernatant water of filter FL-A was inoculated with the fungus, while filter FL-B was used as control. The best percentage of dye removal by the fungus *Trametes versicolor* in combination with the slow sand filtration was 44.74% achieved 24 hours after the maximum laccase activity. The results show that the combination of the fungus *T. versicolor* with slow sand filtration treatment presents no great potential for color removal at 21 days of treatment, whereas microbial products generated interfere with the filtration process, lowering the efficiency of the physical process. However, with the restriction of the handling time into 24 hours after the maximum enzymatic activity, combined treatment showed good efficiency.

**Keywords:** decoloration; slow sand filtration; dye; *Trametes versicolor*.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia de Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO), Brasil.

<sup>2</sup>Lecturer in Environmental Engineering, UG Programme Director of Environmental Engineering, Department of Civil, Environmental & Geomatic Engineering, University College London – Reino Unido.

<sup>3</sup>Departamento de Química do Instituto Federal de Goiás (IFG) – Inhumas (GO), Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da UFG – Goiânia (GO), Brasil.

**Endereço para correspondência:** Paulo de Tarso F. Sales – Laboratório de Enzimologia – Avenida Universitária, Setor Universitário – 74605-220 – Goiânia (GO), Brasil – E-mail: paulo@tecpam.com.br

**Recebido:** 20/12/12 – **Aceito:** 27/09/13 – **Reg. ABES:** 765

## INTRODUÇÃO

Os diversos problemas ambientais e de saúde pública advindos do despejo de corantes nos rios faz com que haja uma necessidade diária da busca de soluções para a degradação e mineralização desses compostos xenobióticos recalcitrantes. Estudos já realizados mostraram que a descoloração de resíduos têxteis contendo corantes pode ser levada a cabo por enzimas produzidas por microrganismos (GRAÇA, 2000; BARBOSA *et al.*, 2006).

O corante FD&C azul nº 2 Indigotina é empregado como aditivo de cor em alimentos, produtos de perfumaria e beleza. Comercialmente, é denominado FD&C azul nº 2 Indigotina, com sinônimos C.I. *Food Blue 1*, Carmin Indigo, C.I. *Acid Blue 74*. Quimicamente, consiste em um sal dissódico, cuja fórmula química é  $C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$ . Seu uso no Brasil é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ele também é empregado na União Europeia (BERDICK, 1982) e no Japão, desde a década de 1980 (VETORAZZI, 1980; THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION, 2013).

O processo de filtração lenta foi desenvolvido em Paisley na Escócia ainda no século XIX, para atender às necessidades de uma indústria de branqueamento (BAKER, 1949), e mais tarde foi implementado em Londres, para tratamento das águas de abastecimento provenientes do Rio Tâmis (HUISMAN & WOOD, 1974). A simplicidade do projeto e os moderados custos de instalação e manutenção, aliados à facilidade de operação e à produção de água de excelente qualidade do ponto de vista bacteriológico, torna o processo de filtração lenta uma alternativa de abastecimento para pequenas comunidades (CAMPOS, 2010; CLEARY, 2005). A alta eficiência de tratamento de água obtida por filtros lentos de areia é em parte explicada pela taxa de filtração lenta ( $0,1$  a  $0,3$  m.h<sup>-1</sup>) e o tamanho efetivo do particulado usado ( $0,1$ – $0,3$  mm), mas também é atribuída aos processos biológicos da camada de impurezas (*schmutzdecke*), que se acumula acima da superfície da areia e no interior das camadas superiores do leito de areia (HUISMAN & WOOD, 1974).

Quando utilizado em combinação com outras tecnologias de tratamento, os filtros lentos provaram ser eficazes na eliminação total de todos os agentes patogênicos, na remoção de partículas coloidais, na redução de compostos orgânicos dissolvidos, incluindo os que contribuem para gosto, cor e odor, sulfeto de hidrogênio, algas, toxinas orgânicas, arsênio, urânio e outros metais pesados (MANZ, 2004). A filtração lenta foi capaz de remover cor somente quando precedida de ozonização (GRAHAM, 1999), o que a torna não apropriada para pequenas comunidades. Contudo, esse mesmo processo já demonstrou eficiência para remoção de matéria orgânica solúvel em efluente doméstico (LINLIN *et al.*, 2011), bem como filtração simples e filtração lenta para tratamento de águas para abastecimento público (ZHANG *et al.*, 2012). A remediação de arsênio na água de abastecimento foi estudada, combinando a filtração lenta com a adição do reagente de Fenton (JASUDKAR *et al.*, 2012).

O emprego de métodos biológicos e químicos combinados no tratamento de efluentes têxteis tem mostrado grande eficiência. Os efluentes contendo os corantes trifenilmetano, indigoides, azo e antraquinônicos, tratados com a lacase imobilizada do fungo *Trametes hirsuta*, tiveram a toxicidade reduzida em 80% (GUARATINI & ZANONI, 2000; PASCHOAL & TREMILIOSI-FILHO, 2005). Barbosa e Santiago (2005) descreveram a viabilidade da descoloração de corantes tipo antraquinona. Além disso, foi anteriormente demonstrado por meio da adição de células fúngicas nas paredes em filtros lentos (FURTNER *et al.*, 2007; BERGSTRAND *et al.*, 2011) que a atividade da enzima no biofilme (i.e. *schmutzdecke*) era o principal parâmetro responsável pela eficiência do filtro. Kim *et al.* (2004), em um estudo utilizando a degradação de corantes por fungos, seguida de filtração por membrana, relatou um aumento da eficiência na remoção da toxicidade e do carbono orgânico total nesse sistema, sugerindo que a degradação por fungos pode ser melhorada quando associada a um procedimento de filtração.

Portanto, a capacidade de produção de enzimas pelos fungos *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes* e *Phanerochaete chrysosporium*, e a degradação de corantes e outros compostos (RYAN *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2003) por essas enzimas, permitiram a formulação da hipótese de que fungos de degradação branca, associados ao sistema de filtração lenta, podem ser capazes de descolorir algumas soluções de corantes artificiais e melhorar a qualidade da água tratada pelo processo combinado (HENDEL *et al.*, 2001).

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a remoção do corante FD&C azul nº 2 Indigotina em água pela produção de enzimas fenoloxidasas e peroxidases pelo fungo de decomposição branca *Trametes versicolor* associada à tecnologia de filtração lenta.

## METODOLOGIA

### Microrganismo

*Trametes versicolor* CCT 4521 (Coleção Tropical da Fundação André Tosello, Campinas, SP).

### Meios de cultura

Os meios de cultura sólido do tipo BGA (Batata, Glicose, Ágar) foram utilizados para o desenvolvimento dos cultivados fúngicos para a manutenção das cepas — um meio sólido. Já o meio de cultura BGC (Batata, Glicose, Caldo) foi utilizado como meio para o desenvolvimento dos cultivados fúngicos dos experimentos — um meio líquido.

### Determinação do volume da biomassa

Para determinação do aumento da biomassa cultivada por 28 dias, foi realizado um ensaio de medição de sólidos (APHA, 1999, modificado).

## Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da lacase (Lcc) foi determinada por meio da oxidação da seringaldazina ( $\epsilon_{525\text{nm}}=65.000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (SZLARZ *et al.*, 1989). Para manganês peroxidase (MnP), o método utilizado foi o do vermelho de fenol como substrato, em que a absorbância para leitura foi 610 nm, e a atividade de MnP expressa como  $\Delta\text{Abs.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  (KUMAHARA *et al.*, 1984). A atividade enzimática de lignina peroxidase (LiP) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ( $\epsilon_{310\text{nm}}=93000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (TIEN & KIRK, 1984 – modificado).

A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$U = 106 * \Delta E / \epsilon * R * \Delta t \quad (1)$$

Em que:

U: Atividade enzimática em  $\text{absorbância}.\text{min}^{-1}$ ;

$\epsilon$ : coeficiente de extinção molar de cada substrato, conforme dados da literatura;

$\Delta E$ : Absorbância em comprimento de onda específico em  $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ;

$\Delta t$ : Tempo de reação em minutos;

R: Quantidade de caldo enzimático em mL.

As análises enzimáticas de Lcc, MnP e LiP foram realizadas diariamente em amostras simples do sobrenadante do filtro A.

## Preparação da suspensão de esporos

Para a preparação da suspensão de esporos, inicialmente, o fungo foi cultivado por 5 dias em meio sólido, a 28°C, em ambiente sem luz. A suspensão de esporos foi conseguida mediante a raspagem da biomassa de 6 placas de Petri, contendo o fungo e esporos cultivados por 5 dias, lavadas com solução salina de NaCl (0,9%) e reservada em frasco âmbar esterilizado. Desta suspensão, foi retirado o volume de 10  $\mu\text{L}$  e acrescentado 990  $\mu\text{L}$  da solução salina, sendo reservado em eppendorf. A solução foi colocada em câmara de Neubauer (IMPROVD-CHINA) e, posteriormente, levada ao microscópio óptico STUARDLAB-Poland, sendo efetuada a contagem de esporos, na resolução 40x. Determinada a quantidade de esporos, estes foram adicionados em meio de cultura líquido, em quantidade suficiente para inocular  $10^7$  esporos. $100 \text{ mL}^{-1}$  a 150 mL de meio de cultura autoclavado. A suspensão de esporos foi mantida em SHAKER (C24KC, EDSON, USA), em temperatura controlada de 28°C e agitação de 150 rpm (rotações por minuto), em ambiente sem luz, durante 7 dias.

## Soluções de corantes

Foram preparadas soluções de corante FD&C azul n° 2 Indigotina nas concentrações 2  $\text{mg.L}^{-1}$ , 5  $\text{mg.L}^{-1}$  e 6  $\text{mg.L}^{-1}$ , e o período máximo

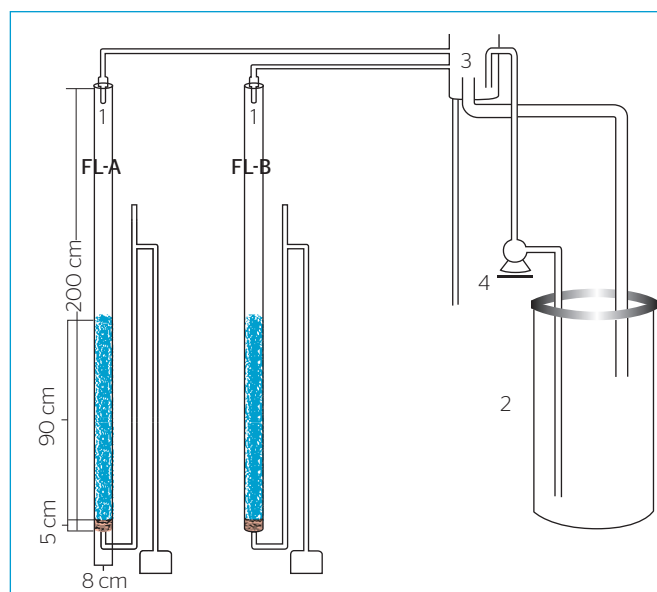
de armazenamento foi de 45 dias. O comprimento de onda máximo determinado em curva espectral foi de 610 nm. A água utilizada para a preparação foi retirada de poço com profundidade aproximada de 20 m, situado na Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, previamente caracterizada, conforme laudo da Companhia de Saneamento do Estado de Goiás S.A. (SANEAGO), e atendeu às características descritas em Di Bernardo (1993) (turbidez: até 10 uT, cor verdadeira: até 5  $\text{mg.L}^{-1}$  Pt Co, ferro total: até 1  $\text{mg.L}^{-1}$ , pH: entre 6,0 e 9,0, coliformes totais: máximo de 1.000 NMP/100 mL).

## Colunas de filtração lenta descendente

Foram confeccionados dois filtros em acrílico de 8 cm de diâmetro e 295 cm de altura, com meio filtrante de 90 cm, para a montagem do filtro. O meio filtrante foi constituído por areia de granulometria previamente determinada (diâmetro efetivo dos grãos de 0,55 mm). A Figura 1 apresenta o esquema da instalação piloto de filtros lentos em escala laboratorial, semelhante ao que foi construído, sendo composto por: (1) dois filtros lentos de areia em material acrílico, (2) um reservatório de armazenamento de água bruta em fibra de vidro, (3) um tanque regularizador de vazão, (4) uma bomba centrífuga monofásica – FAMAC-FS6-P1/3cv – SP, para recalque da água bruta, e controladores de vazão por gotejamento.

Carreiras de filtração (tratamento das soluções de corantes até a inviabilidade do fungo), foram feitas, acompanhadas diariamente.

Antes da realização dos tratamentos, os meios filtrantes foram tratados com água destilada, e as soluções filtradas foram acompanhadas espectrofotometricamente, a fim de eliminar toda a matéria orgânica solúvel presente.



**Figura 1** - Desenho esquemático da instalação dos filtros lentos de areia intitulados FL-A e FL-B.

## Tratamento das soluções

As duas colunas de filtração, denominadas FL-A e FL-B, foram utilizadas nos experimentos. Entretanto, somente na FL-A foi inoculado o fungo na coluna do sobrenadante, e a coluna FL-B foi utilizada como controle (sem inoculação do fungo). As colunas foram operadas no período de 12 meses, sendo realizadas duas carreiras de filtrações, com 22 e 21 dias, para estabilização do biofilme e do filtrado. A taxa de filtração foi estabelecida em  $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ . O volume do sobrenadante na coluna de filtração não foi mantido constante, contudo foi mantido o abastecimento da solução por processo de gotejamento de aproximadamente  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

As séries dos ensaios de tratamento foram realizadas com somente adição de esporos. No intervalo das carreiras de filtração, os filtros foram mantidos filtrando com solução corante sem fungos.

A perda de carga ao longo do meio filtrante foi monitorada diariamente por piezômetros instalados a 5, 10 e 15 cm do início do meio filtrante.

## Preparação e manutenção das amostras

Após os respectivos períodos de tratamento das soluções de corante, estas foram filtradas em papel de filtro Whatmann 1,3 mm, sendo o caldo filtrado guardado sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ . Todas as amostras foram filtradas posteriormente em membrana Milipore<sup>®</sup>  $0,45 \mu\text{m}$  e imediatamente refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$  (SANTIAGO, 1999). Antes das medições enzimáticas por meio de absorbância no UV-vis, as amostras foram centrifugadas durante 20 min. a 8.000 rpm.

## Teste de viabilidade do fungo

A avaliação da viabilidade do fungo (capacidade de crescimento) foi efetuada, recolhendo-se uma pequena porção da biomassa e inoculando-a em meio sólido BGA, que posteriormente foi mantido em ausência de luz por três dias para verificar se houve o crescimento do halo da biomassa, o que indicaria que o fungo era capaz de reproduzir-se. Tal procedimento foi adotado, pois o meio era pobre em nutrientes, o que poderia impedir o crescimento fúngico.

## Acompanhamento espectrofotométrico

O desenvolvimento do tratamento das soluções de corantes foi acompanhado com leituras em 610 nm em espectrofotômetro modelo B 582, marca MICRONAL, utilizando-se cubetas de quartzo. O comprimento de onda máximo das amostras de solução de corante foi de 610 nm, determinado após varredura de 300 a 700 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos foram conduzidos com taxa de filtração definida em  $1 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}$ , com vazão de  $3,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , possibilitando um tempo de

detenção suficiente para ação da enzima. Para realização dos ensaios, foi adicionado ao sobrenadante do sistema de filtração lenta 150 mL do meio de cultura líquido, com os esporos ( $10^7$  esporos. $100 \text{ mL}^{-1}$ ). A solução usada tinha essas características: cor – 17 mg Paco, pH – 6,7, turbidez – 3,8 Lt e coliformes 2,6 NMP/100 mL.

Na primeira carreira de filtração, que totalizou 21 dias de tratamento, a descoloração máxima (44,74%) ocorreu 24 horas depois do pico de produção da lacase (também observado com CHEN *et al.*, 2003), o que indicou uma relação direta entre atividade enzimática e descoloração. A diferença percentual da descoloração do sobrenadante do filtro FL-A em relação ao filtrado após 7 dias foi apenas 10%, indicando assim que a descoloração da solução se dá basicamente no sobrenadante, na presença de lacase. No filtro FL-B, a diferença entre a máxima descoloração no sobrenadante e o filtrado foi de 5%. Contudo, a diferença percentual entre a descoloração do filtrado de FL-A e do FL-B, após sete dias de tratamento, foi de apenas 7%. Cabe salientar que não foi detectada lacase, manganês peroxidase nem lignina peroxidase nos extratos filtrados do filtro FL-A (dados não mostrados) e somente lacase foi detectada no sobrenadante do FL-A. O fato de não serem detectadas as enzimas MnP e LiP no extrato filtrado do FL-A não significa que o referido microrganismo não é capaz de sintetizá-las (BLANQUEZ *et al.*, 2004; FONT *et al.*, 2006; SALES, 2007). Nas condições descritas, o *T. versicolor* foi capaz de sintetizar lacase. Além disso, Blaquez *et al.* (2004) e Blaquez *et al.* (2006) perceberam que a síntese enzimática está relacionada ao meio de cultura e à disponibilidade de nutrientes para microrganismos.

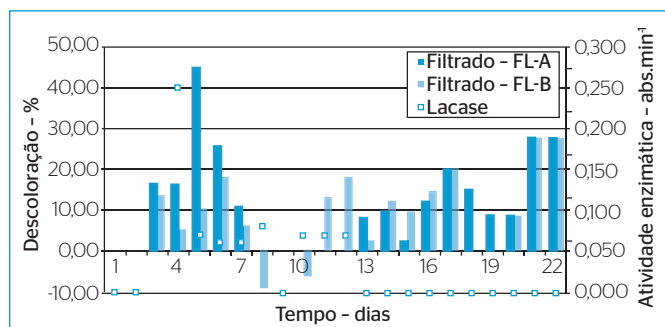
No filtro FL-B, o pico de descoloração se deu após 20 dias de tratamento, possivelmente em decorrência do término do período de aclimatação do biofilme ao contaminante, conforme já foi observado por Grützmacher *et al.* (2002).

Os perfis das curvas dos filtrados de A e B (Figura 2) mostram que a descoloração não foi satisfatória e foi mais relevante no início do tratamento.

Nos sétimo e nono dias de tratamento, foi observado um aumento de coloração em 610 nm no extrato filtrado do filtro FL-B, conforme mostrou o gráfico, que pode ter sido influenciado pela dissolução de material solúvel presente no meio filtrante.

De acordo com Kahraman e Gurdal (2002), a produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento do fungo, como a composição do meio de cultura (relação C/N), pH, temperatura, taxa de aeração, etc. o que foi confirmado com nosso estudo, visto que a matéria orgânica presente no meio de cultura líquido não mais foi detectada após o primeiro dia de tratamento (dados não mostrados) e não foi suficiente para desenvolver a comunidade biológica do filtro.

Apesar de a atividade da lacase apresentar decaimento ao longo da realização do tratamento, a descoloração não foi tão pronunciada a



**Figura 2** - Percentual da descoloração na carreira 1 dos filtros FL-A e FL-B versus atividade enzimática de lacase, com adição de esporos e meio de cultura líquido.

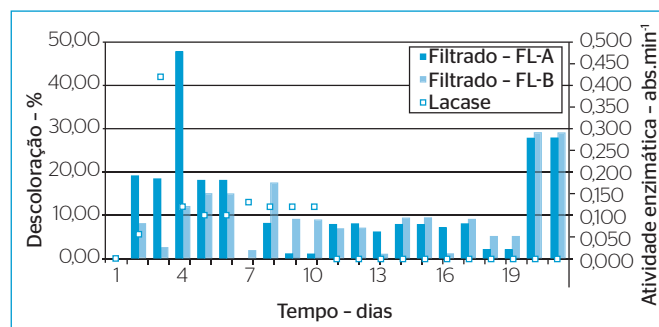
partir de 11 dias de tratamento, o que pode indicar que o fungo produziu compostos que alteraram a coloração da solução (GARCIA, 2006), o que também foi observado entre os dias 7 e 9. Após 20 dias de tratamento, os filtrados de ambos os filtros (FL-A e FL-B) apresentaram a mesma taxa de descoloração, indicando que o processo de inoculação de fungos ao sobrenadante em um sistema de filtração lenta, após 20 dias de tratamento, não apresentava vantagens em relação ao uso único de filtração lenta.

Após 21 dias de tratamento, foi observado que os esporos adicionados ao sobrenadante do filtro FL-A perderam a viabilidade reprodutiva (morte celular), sendo o processo de tratamento interrompido.

A segunda carreira de filtração foi realizada por 20 dias e foi executada da mesma forma que a primeira carreira. A Figura 3 mostra o perfil da produção enzimática em relação ao decaimento da coloração corante no filtrado do FL-A e filtrado do FL-B durante a carreira 2.

Na segunda carreira de filtração, a descoloração máxima observada foi similar à primeira carreira (48,13%), bem como ela se deu após o pico de atividade enzimática da lacase (24 h). Diferentemente da primeira carreira de filtração, a segunda carreira não apresentou aumento da coloração do filtrado durante todo o tratamento, fato que pode ser explicado pela troca do meio filtrante (nos primeiros 5 cm). Também se repetiu o fato de o extrato filtrado dos filtros FL-A e FL-B, após 20 dias de tratamento, não apresentarem díspares descolorações.

Em ambas as carreiras de filtração e em ambos os filtros (FL-A e FL-B), após 19 dias de tratamento, a descoloração apresentou maior eficiência. Nos dois casos, a estabilização do biofilme nos filtros FL-A e FL-B contribuiu fortemente para a descoloração da solução de corante, ou seja, para a filtração lenta combinada com fungos ser utilizada com maior eficiência na remoção da cor da solução, o tempo mínimo de tratamento deve ser de 19 dias, diferentemente do que acontece quando se adiciona esporos e meio de cultura líquido, situação em que o melhor tempo de tratamento está relacionado à maior atividade enzimática da lacase (2 a 3 dias).



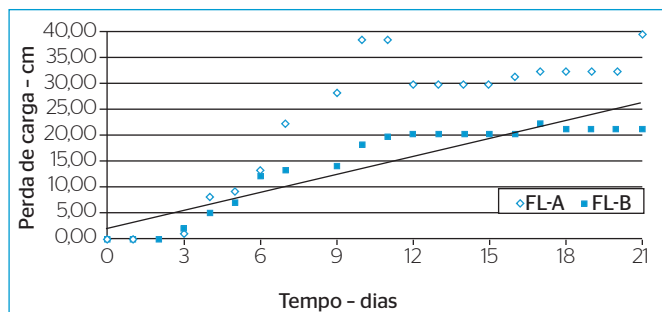
**Figura 3** - Percentual da descoloração na carreira 2 dos filtros FL-A e FL-B versus atividade enzimática de lacase, com adição de esporos e meio de cultura líquido.

A maior perda de carga em ambas as carreiras (1 e 2) observada no piezômetro localizado a 5 cm abaixo do topo da areia (Figura 4) foi maior no filtro FL-A do que no filtro FL-B, no entanto a carreira de filtração foi interrompida em razão da baixa eficiência na descoloração e submersão do fungo após 21 dias de tratamento, bem como da perda da viabilidade celular do fungo. Nos outros piezômetros, a perda de carga foi acompanhada, mas os dados não são mostrados, visto que a perda de carga mais proeminente é observada no piezômetro posicionado a 5 cm do início do filtro (MURTHA & HELLER, 2003).

Aos 21 dias de tratamento, a perda de carga no filtro FL-A foi cerca de 38 cm, e a perda de carga no filtro FL-B, de cerca 21 cm (Figura 4). Nesse caso, o meio filtrante da coluna FL-A não colmatou totalmente e ambos os filtros apresentaram filtrado (espectrometricamente monitorado) com qualidade semelhante, porém não havia mais descoloração. A colmatação do meio filtrante se deu principalmente pela produção de exopolissacarídeos, que constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica, participando com mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede da hifa (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINEZ, 1996).

A amostra do fungo *Trametes versicolor* retirado do filtro FL-A cultivada em placa de Petri não apresentou crescimento, indicando a morte do fungo provavelmente por baixa concentração de nutrientes acrescida de baixa disponibilidade de oxigênio no sobrenadante do filtro. As condições externas, como disponibilidade de oxigênio, temperatura e nutrientes, interferem no crescimento dos fungos e na produção de enzimas; assim, um meio contendo um nutriente adequado pode resultar em crescimento mais elevado e maior produção de enzimas (KIM *et al.*, 2004; ROGALSKI *et al.*, 1991; RYAN *et al.*, 2007). É possível que o aumento da perda de carga no filtro FL-A possa ser contornado por modificações do procedimento de adição do fungo ao FL-A ou por métodos de imobilização do fungo (MAHMOUD *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2009), os quais também favoreceriam sua atividade de degradação de vários compostos tóxicos, inclusive fenóis e polifenóis, corantes azo, entre outros.





**Figura 4** - Monitoramento da perda de carga nos primeiros 5 cm do meio filtrante nos filtros lentos FL-A e FL-B (carreiras 1 e 2).

As perdas de carga do FL-A com fungo *Trametes versicolor* apresentaram comportamento variável nas carreiras de filtração, sendo que a turbidez máxima encontrada foi notada no sobrenadante. De acordo com Di Bernardo (1993), a variação da perda de carga e do tempo de operação dos filtros ocorre em função da turbidez da água afluyente e, neste caso, as maiores perdas de carga foram observadas nas carreiras de filtração com maior turbidez no sobrenadante. A acumulação de material inerte e microrganismos capturados, com o aumento da biomassa, aumenta a resistência hidráulica ao fluxo que se manifesta como um processo de aumento de perda de carga (GRAHAM, 1999). Em todas as carreiras de filtração, as perdas de carga no filtro FL-A foram superiores às do FL-B, indicando que a biomassa do fungo gerada durante o tratamento causou o aumento da perda de carga, reduzindo assim a duração da carreira de filtração.

A presença de enzimas nos filtros lentos, oriundas de bactérias, relatada por Hendel *et al.* (2001), pode ser responsável pela decomposição da matéria orgânica, disponibilizando-a para outros microrganismos ali presentes. Isso indica que, analogamente, as enzimas oriundas dos fungos poderiam estar potencializando a atividade microbiana na degradação do corante, o que possivelmente justifica a associação dos fungos de decomposição branca à filtração lenta, uma vez que a ação enzimática lignolítica consiste principalmente da degradação de moléculas complexas em moléculas mais simples para utilização no metabolismo fúngico.

Comparando-se os gráficos de perda de carga e de descoloração em ambas as carreiras (Figuras 2 a 4), observa-se que a estabilização do biofilme do filtro se deu possivelmente após 19 dias de tratamento, indicado pela estabilização da perda de carga. Mesmo com a perda de viabilidade reprodutiva dos esporos inoculados, a partir de 19 dias de tratamento, o filtro FL-A comportou-se como o filtro FL-B, mostrando assim que, mesmo em condições iniciais diferentes, ao final dos experimentos, os filtros apresentaram água filtrada com qualidade similar.

As características inerentes aos fungos de decomposição branca, como a adaptação a valores extremos de pH, a capacidade de degradação

de uma gama de compostos tóxicos recalcitrantes e o desenvolvimento na ausência de luz, indicam possibilidades futuras para a criação de ambientes seletivamente favoráveis ao desenvolvimento das colônias de fungos.

O tempo de tratamento necessário para a descoloração da solução com corante quando se inoculou o fungo no sobrenadante foi de 2 a 3 dias, o que corresponde a 24 horas após o pico de produção de lacase. Para o tratamento exclusivo com a filtração lenta, o tempo necessário para se alcançar a descoloração máxima foi a partir de 20 dias.

## CONCLUSÕES

A visualização da correspondência entre a descoloração e a atividade enzimática da lacase foi dificultada em razão de a atividade enzimática persistir depois do pico de produção e se prolongar por alguns dias, fazendo com que a descoloração máxima ocorresse geralmente após o pico da produção enzimática. Além disso, a enzima sofreu diluição pelo aumento da lâmina d'água sobrenadante. No entanto, a comparação entre a descoloração nos extratos filtrados dos filtros FL-A e FL-B comprovou a ação da lacase produzida pelo fungo *Trametes versicolor* como agente principal sobre a descoloração do corante.

A associação do fungo à filtração lenta mostrou não melhorar a eficiência de remoção após 21 dias de tratamento, uma vez que a diferença entre as eficiências de descoloração dos filtros foi apenas de 7%. A inoculação do fungo no sobrenadante do filtro demonstrou não ser recomendável para tempos de tratamentos acima de quatro dias, pois a biomassa e os polissacarídeos gerados no processo diminuíram a eficiência do filtro.

Nestes experimentos, não foram detectadas enzimas MnP e LiP, porém não se pode afirmar que elas não tenham sido produzidas, assim como também não se pode descartar a ação conjunta de outros fatores que poderiam agir ou intermediar a descoloração pela lacase do fungo *Trametes versicolor*.

Um fator a ser estudado é a geração de subprodutos do corante durante o tratamento do efluente, formados pela oxidação enzimática, que podem estar ligados ao aumento da coloração das soluções.

Além disso, em decorrência do fato de a água afluyente ao filtro não ser um meio nutritivo que garanta o crescimento do fungo, recomenda-se avaliar o tempo de tratamento para esse processo combinado de filtração lenta com fungos no tratamento de águas residuárias, para aplicações futuras.

O uso combinado da biorremediação e filtração lenta deve ser sempre avaliado com base na remoção máxima do contaminante, atividade enzimática e tempo de tratamento, pois assim a otimização de todo o processo será operacionalmente viável.

## REFERÊNCIAS

- APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WEF – Water Environment Federation. (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater*, 20<sup>th</sup> ed. Washington: APHA, AWWA, WEF.
- BAKER, M.N. (1949) *The quest for pure water*. USA: AWWA.
- BARBOSA, D.R. & SANTIAGO, M.F. (2005) Descoloração do corante antraquinona (remazol brilhante laranja) por fungos de decomposição branca. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2, p. 32-33.
- BARBOSA, D.R & SANTIAGO, M.F.; SALES, P.T.F.; WATANABE, R.A.M. (2006) Fungos Produtores de Fenoxidases capazes de descolorir corantes. Resumo expandido, *Congresso de Microbiologia*.
- BERDICK, M. (1982) Safety of food colors In: HANTHCOCK, J.N. (Ed.) *Nutritional toxicology*. New York: Academic Press, v. 1, p. 383-434.
- BERGSTRAND, K.J.; KHALIL, S.; HULTBERG, M.; ALSANIUS, B.W. (2011) Cross response of slow filters to dual pathogen inoculation in closed hydroponic growing systems. *The Open Horticulture Journal*, v. 4, p. 1-9.
- BLANQUEZ P.; CASAS N.; FONT X.; GABARRELL X.; SARRA M.; CAMINAL G.; VICENT T. (2004) Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, v. 38, p. 2166-2172.
- BLANQUEZ, P.; SARRA M.; VICENT, M.T. (2006) Study of the cellular retention time and the partial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process. *Water Research*, v. 40, p.1650-1656.
- CAMPOS, L.C. (2010) Slow sand filtration - a technology for this century and beyond. *Water and Sewerage Journal*, v. 3, p. 28-30.
- CHEN, S.; MA, D.; GE, W.; BUSWELL, J. (2003) A. induction of laccase activity in the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 218, p. 143-148.
- CLEARY, S.A. (2005) *Sustainable drinking water treatment for small communities using multistage slow sand filtration*. Thesis (Master of Applied Science in Civil Engineering). Ontario, Canada: University of Waterloo.
- DI BERNARDO, L. (1993) *Métodos e técnicas de tratamento de água*. Vol. II. Rio de Janeiro: ABES. 498 p.
- FONT, X.; CAMINAL, G.; GABARREL X.; VICENT T. (2006) Treatment of toxic industrial wastewater in fluidized and fixed-bed batch reactors with *Trametes versicolor*: influence of immobilisation. *Environmental Technology*, v. 27, p. 845-854.
- FURTNER, B; BRAND, T; JUNG, V; ALSANIUS, B.W. (2007) Effect of polysaccharides in slow filters integrated into closed hydroponic greenhouse systems. *Journal of Horticultural Scientific Biotechnology*, v. 82, p. 55-60.
- GARCIA, T.A. (2006) *Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus**. Dissertação (Doutorado em Biologia Molecular). Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 90 p.
- GRAÇA, M.B.S. (2000) *Aplicação de sistemas enzimáticos à degradação de corantes têxteis*. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil). Portugal: Universidade do Minho, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Têxtil. 156 p.
- GRAHAM, N.J.D. (1999) Removal of humic substances by oxidation/biofiltration processes - a review. *Water Science Technology*, v. 40, p. 141-148.
- GRÜTZMACHER, G.; BÖTTCHER, G.; CHORUS, I.; BARTEL H. (2002) Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environmental Toxicology*, v. 17, p. 386-394.
- GUARATINI C.C.I. & ZANONI M.V.B. (2000) Corantes têxteis. *Química nova*, v. 23, p. 71-78.
- GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A.T. (1996) Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, v. 281, p. 143-154.
- HENDEL, B.R.; MARXSEN, JR.; FIEBIG, D.; PREU, G. (2001) Extracellular enzyme activities during slow sand filtration in a water recharge plant. *Water Research*, v. 35, p. 2484-2488.
- HUISMAN, L & WOOD, W.E. (1974) *Slow sand filtration*. Geneva: World Health Organisation.
- JASUDKAR, D.; RAKHUNDE, R.; DESHPANDE, L.; LABHASETWAR, P.; JUNEJA, H.D. (2012) Arsenic remediation from drinking water using Fenton's reagent with slow sand filter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 89, p. 1231-1234.
- KAHRAMAN, S.S. & GURDAL, I.H. (2002) Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 215-217.
- KIM T.; LEE Y.; YANG J.; LEE B.; PARK C.; KIM S. (2004) Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. *Desalination*, v. 168, p. 287-293.
- KUMAHARA, M.; GLENN J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, v. 169, p. 242-250.
- LINLIN, W.; XUAN, Z.; MENG, Z. (2011) Removal of dissolved organic matter in municipal effluent with ozonation, slow sand filtration and nanofiltration as high quality pre-treatment option for artificial groundwater recharge. *Chemosphere*, v. 83, p. 693-699.
- LU, Y.; YAN, L.; WANG, Y.; ZHOU, S.; FU, J.; ZHANG, J. (2009) Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 1091-1097.

- MAHMOUD, M.E.; YAKOUT, A.A.; ABDEL-AAL, H.; OSMAN, M. (2013) Immobilization of *Fusarium verticillioides* fungus on nano-silica (NSi-Fus): a novel and efficient biosorbent for water treatment and solid phase extraction of Mg(II) and Ca(II). *Bioresource Technology*, v. 134, p. 324-330.
- MANZ, D.H. (2004) New horizons for slow sand filtration. *Proceedings of the Eleventh Canadian National Conference and Second Policy Forum on Drinking Water and the Biennial Conference of the Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water, Promoting Public Health Through Safe Drinking Water*, Calgary, Alberta, v. 3-6, p. 682-692.
- MARTINS A.M.M.; LIMA, N.; SILVESTRE A.J.D.; QUEIROZ, M.J. (2003) Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*, v. 5, p. 52, 967-973.
- MURTHA N.A. & HELLER L. (2003) Avaliação da influência de parâmetros de projeto e das características da água bruta no comportamento de filtros lentos de areia. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 8, n. 4, p. 257-267.
- PASCHOAL, F.M.M. & TREMILIOSI-FILHO, G. (2005) Aplicação da tecnologia de eletrofluoculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 766-772.
- ROGALSKI, J.; LUNDELL, T.; LEONOWISZCZ, A. (1991) Production of laccase, Lignin Peroxidase and Manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on conditions culture. *Acta Microbiológica Polonica*, v. 40, p. 221-234.
- RYAN, D.; LEUKES, W.; BURTON, S. (2007) Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 579-587.
- SALES, P.T.F. (2007) *Estudo da tratabilidade biológica e fotocatalítica do efluente de uma indústria farmacêutica da região de Goiânia-GO*. Dissertação de mestrado. Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Meio Ambiente, Universidade Federal de Goiás.
- SANTIAGO, M.F. (1999) *Estudo de substâncias de baixa massa molar que mimetizam as fenoloxidasas com aplicações em tratamento de efluentes industriais*. Tese de doutorado. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. (1989) Production of phenoloxidasas and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycology*, v. 81, p. 234-235.
- THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. List of designated additives. Disponível em: <<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/list-desin.add-x>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. (1984) Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 81, p. 2280-2284.
- VETORAZZI, G. (1980) Toxicological profiles of food colorants. In: *Handbook of international food regulatory toxicology*. Lancaster: MTP Press, v. 2, p. 13-86.
- ZHANG, G.; SONG, W., WU, F.; YUE, Z.; YANG, S. (2012) *Study on rough filtration plus slow sand filtration techniques for cellar water of villages and towns in Northwest China*. In: *Geomatics for Integrated Water Resources Management (GIWRM)*, International Symposium on, p. 1-7.