

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE UMA INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE CASTANHA DE CAJU LOCALIZADA EM FORTALEZA, CEARÁ.

Sâmara SALES (1); Suelem FERREIRA (2); Celli MUNIZ (3); Bemvindo GOMES (4)

(1) Centro Federal de Educação Tecnológica do Estado do Ceará (CEFET-CE), Av. 13 de Maio, 2081 - Benfica - Fortaleza/CE, Cep:60040-531, Fone +55 (85) 3307-3666 Fax (85) 3307-3711, e-mail: samarakms@yahoo.com.br

(2) CEFET-CE, e-mail: suelenferreira@hotmail.com

(3) Embrapa Agroindústria Tropical, e-mail: celli@cefetce.br

(4) CEFET-CE, e-mail: bemvindo@cefetce.br

RESUMO

Considerando o grande potencial poluidor das atividades industriais, tem sido observada nas últimas décadas, significativa preocupação em relação aos impactos gerados com o lançamento das águas residuárias produzidas pela atividade industrial. Neste contexto, o biotratamento com fungos filamentosos tem se constituído em uma alternativa interessante no tratamento de efluentes industriais ricos em substâncias recalcitrantes, como é o caso das águas residuárias oriundas das indústrias de beneficiamento de castanha de caju. A identificação através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos fungos autóctones do respectivo efluente tem elevada importância no estudo dessa tecnologia. O objetivo deste trabalho foi isolar a microbiota fúngica filamentosa presente em amostras de águas residuárias de beneficiamento de castanha de caju e observar através de MEV as características ultraestruturais dos fungos isolados para sua identificação. Foram realizadas três coletas no período de Março a Junho de 2007 nas diferentes etapas do tratamento do efluente. As amostras foram plaqueadas através da técnica "spread-plate", em seguida as colônias isoladas foram processadas, de acordo com Kitajima, para visualização em MEV e posterior identificação. Foram identificadas cinco diferentes colônias que se enquadraram como hifomicetos.

Palavras chaves: biotratamento, efluentes industriais, fungos autóctones.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de beneficiamento da castanha de caju é uma das atividades mais exercidas no Nordeste Brasileiro, sendo o estado do Ceará um dos maiores produtores. Essa intensa atividade produtiva gera grandes quantidades de efluentes líquidos potencialmente poluidores devido à presença de substâncias fenólicas, fazendo-se necessário o estudo de alternativas que melhorem os processos de tratamento, minimizando os impactos gerados pelo lançamento desses efluentes no ambiente.

Diante da adoção de uma gestão sustentável, dessas empresas, a microbiologia torna-se um tema bastante atraente, uma vez que a utilização de microrganismos na preservação e recuperação dos ecossistemas que sofreram, e continuam sofrendo as consequências das atividades antrópicas, constitui um instrumento da biotecnologia de inestimável valor. A utilização de microrganismos no Saneamento Básico e Ambiental é prática comum do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamento de águas residuárias. É evidente, que a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos (naturais ou sintéticos) e inorgânicos, extraindo destes compostos fontes nutricionais e energéticas, é o que possibilitou o emprego desses agentes biológicos, pela Engenharia Sanitária, como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados ao meio ambiente.

Considerando que os poluentes orgânicos podem ser degradados e removidos pelos microrganismos, através de processos aeróbios ou anaeróbios, transformando-os em compostos menos tóxicos e de baixo peso molecular, como água e dióxido de carbono, dentre estas alternativas os biotratamentos têm despontado com excelente desempenho. Na degradação biológica geralmente ocorre um sinergismo entre os membros da microbiota autóctone, onde determinadas espécies são favorecidas, por utilizarem compostos secundários como fonte de energia, decorrentes do metabolismo de outras espécies (SLATER, 1978).

Neste contexto, o biotratamento com fungos vem sendo muito utilizado, pois os fungos são importantes decompositores que desempenham papéis fundamentais nos ciclos do carbono, do nitrogênio e de outros nutrientes presentes na biosfera (GRIFFIN, 1994), capazes de produzir diversas enzimas que atuam sobre o poluente, tornando-o acessível à biodegradação.

Atualmente, os fungos estão distribuídos nas Divisões Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Existem ainda os fungos chamados mitospóricos, referindo-se às formas anamórficas, outrora denominados de *Fungi Imperfectii*. Estes apresentam hifas modificadas, chamadas conidióforos, que se diferenciam em células conidiogênicas e em conídios (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Os hifomicetos caracterizam-se por constituir-se em formas anamórficas (assexuadas) de fungos ascomicetos ou basidiomicetos. Estão amplamente distribuídos na natureza, em ambientes aquáticos e aéreos. São os fungos mitospóricos (antigamente denominados deuteromicetos) que produzem conídios como estrutura reprodutiva. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* enquadram-se nesse grupo (DUGAN, 2006).

A utilização de fungos autóctones no biotratamento de águas residuárias através da biodegradação apresenta-se como excelente alternativa na escolha da cepa adequada devido principalmente à adaptação fisiológica desses organismos às condições existentes nos efluentes.

A microscopia eletrônica de varredura desponta como método eficaz para caracterização e identificação fúngica uma vez que possibilita a visualização detalhada das estruturas de reprodução, tais como esporos, esporangióforos, cicatrizes de rupturas de esporos, células conidiogênicas, essenciais para o enquadramento taxonômico dos fungos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Estado do Ceará possui o maior parque industrial de beneficiamento da castanha de caju, formado por 16 grandes indústrias, além das minifábricas de menor porte (DOURADO, 1999). Este tipo de indústria

tem contribuído de forma significativa para a poluição do meio ambiente, devido, principalmente à presença de compostos fenólicos em seus efluentes.

Segundo Ururahy *et al.* (1998) bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido citados na literatura como agentes transformadores eficazes, face a habilidade em degradar ampla gama de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes industriais. Para KAMBOUROVA *et al.* (2003), o tratamento biológico apresenta diversas vantagens, pois a mineralização promove a destruição permanente dos resíduos e elimina os riscos de futuras contaminações, aumentando o nível de aceitação pública. Além disto, os processos biológicos quando combinados a outros métodos, tais como físicos – altas temperaturas, químicos e surfactantes, possibilitam o aumento da eficiência total do tratamento (FEITKENHAUER *et al.*, 2003).

Muitos dos compostos recalcitrantes possuem efeitos bactericidas, inibindo o tratamento biológico aeróbio ou anaeróbio utilizando bactérias. Como alternativa ao tratamento biológico por bactérias, surge o que utiliza fungos que vem crescendo e despontando como nova tecnologia para a remoção de substâncias recalcitrantes (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Pode-se ainda citar como fatores indicadores da aplicabilidade dos fungos a tratamentos biológicos sua capacidade de suportar possíveis choques nas cargas orgânica e hidráulica a eles submetidas e intensas e bruscas variações de pH, luz, umidade e oxigênio (SANTAELLA *et al.*, 1996).

Um dos métodos mais usados no tratamento de efluentes industriais é o de *Lodos Ativados*, onde uma população microbiana diversificada age na degradação dos compostos orgânicos em geral. O tratamento biológico de efluentes industriais com culturas puras ou consorciadas apresenta uma alta eficiência na remoção dos compostos químicos, desde que estas estejam adaptadas a esses compostos dentro do sistema de lodos ativados, para que então possam ter um bom desempenho no tratamento (GONZALEZ *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos têm demonstrado o uso de fungos como potenciais agentes no tratamento de resíduos líquidos. Estudos realizados por Robles *et al.* (2000) demonstraram que várias espécies apresentam grande potencial para degradação de ligninas, bem como outros compostos aromáticos e fenólicos. O tratamento de águas residuárias provenientes da indústria de azeite de oliva com *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium* demonstrou-se eficiente na redução da concentração de taninos e outros compostos aromáticos, porém a espécie *Aspergillus niger* não foi capaz de remover compostos fenólicos ao contrário da espécie *Phanerochaete chrysosporium* (GHARSALLAH *et al.*, 1999). No trabalho realizado por Garcia *et al.* (1997) utilizando os fungos *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum* foram capazes de remover concentrações elevadas de compostos fenólicos (469 mg/L) encontrados em águas residuárias, sendo a variação de remoção de fenóis totais entre 66 a 70%.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas quatro coletas em uma indústria de beneficiamento da castanha de caju no período de 15/03/07 a 18/06/07, tendo como pontos de coleta o esgoto bruto (EB), o tanque de aeração (TA), o tanque de repouso (TR) e o efluente final (EF). As amostras foram plaqueadas através da técnica “spread plate”, utilizando como meio de cultura o Potato Dextrose Agar (PDA), acidificado com ácido tartárico. As colônias obtidas foram avaliadas quanto à morfologia, coloração, textura e margem. Em seguida, pequenos pedaços de ágar com crescimento fúngico foram submetidos ao processamento para a microscopia eletrônica, de acordo com KITAJIMA (1997). Para tanto, as amostras foram pré-fixadas em solução de Karnovski modificado (glutaraldeído 25%, Paraformaldeído P.A. e tampão cacodilato 0,05 M em água destilada, pH 8); lavadas com solução tampão cacodilato 0,05 M por 3 vezes, por 10 minutos cada; fixadas em tetróxido de ósmio (ou ácido ósmico) por 1 hora; submetidas ao mordente ácido tânico por 30 minutos; fixadas novamente em tetróxido de ósmio por mais 1 hora; desidratadas em série acetônica crescente (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo cerca de 10 minutos em cada uma; secas em aparelho de secagem ao ponto crítico (EMITECH K850); cobertas com ouro em aparelho metalizador (EMITECH K650) e observadas ao microscópio eletrônico de varredura (ZEISS – DSM 940 A), sob voltagem de 15 KW.

As características culturais das macrocolônias foram determinadas e a ultra-estrutura descrita, de acordo com LACAZ *et al.* (1998), para identificação das colônias em nível de gênero, subgênero e às vezes de espécie.

A seguir, os fungos identificados foram crescidos em ágar Sabouraud inclinado, cobertos com óleo mineral e armazenados a 5°C.

4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Foram obtidos cinco diferentes isolados da indústria de beneficiamento da castanha de caju (codificados como IR, referindo-se a indústria, e EB, TA, TR, EF, referindo-se ao(s) ponto(s) de coleta em que o isolado foi obtido), caracterizados conforme a seguir:

IR 1.1 (EB;TA;TR)

A macrocolônia mostrou-se negra, com porções cotonosas e bordas difusas (Fig. 1a). A MEV mostrou a presença de conidióforos não ramificados e de parede celular lisa. Vesícula mostrou-se globosa, com a superfície coberta de fiáldes unisseriadas e conídios globosos, em cobertura radial (Fig. 1b). Sugere-se sua identificação como *Aspergillus niger* (de acordo com KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

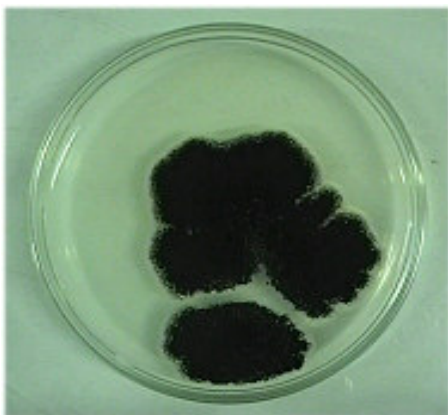


Fig. 1a. – *Aspergillus niger* em placa de petri.



Fig. 1b- Eletromicrografia de *Aspergillus niger*.

IR 1.2 (EB;TR)

A macrocolônia se apresentou com dois tons de coloração, variando de creme a cinza, de aspecto cotonoso, com bordas lisas e limitadas (Fig. 2a). Vesícula mostrou-se globosa, com a superfície coberta de fiáldes unisseriadas e conídios globosos, em cobertura radial (Fig. 2b). Sugere-se sua identificação como *Aspergillus ustus* (de acordo com KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

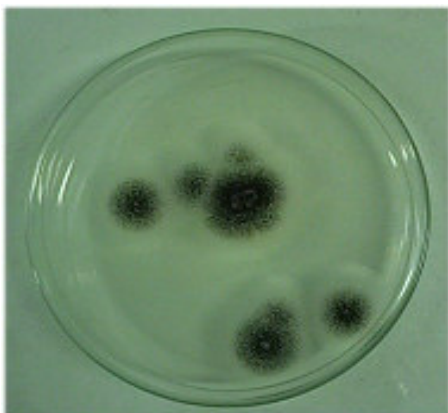


Fig. 2a. – *Aspergillus ustus* em placa de petri.

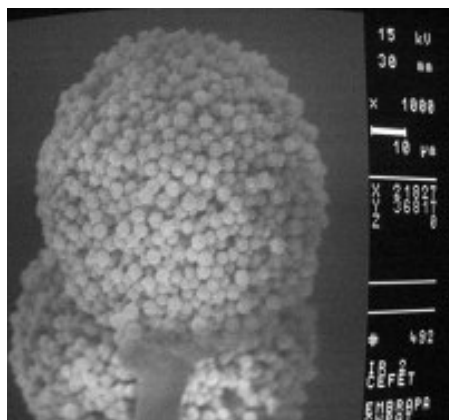


Fig. 2b- Eletromicrografia de *Aspergillus ustus*.

IR 2.2 (encontrada em: EB; EF)

A macrocolônia apresentou-se aveludada com coloração marron em seu anverso (Fig.3a). Nas eletromicrografias, foi observada a presença de hifas não férteis e férteis. As hifas férteis sustentavam conidióforos (estipes) com cerca de 60 μm de comprimento. Os conidióforos apresentavam ramificações em ramos, râmulos e métulas. A ramificação mostrou-se terverticilada, com fiálides ampuliformes e conídios esféricos e lisos (Fig. 3b). Todas essas características indicam sua identificação como *Penicillium* spp. Link, 1809.



Fig. 3a. – *Penicillium* spp em placa de petri.

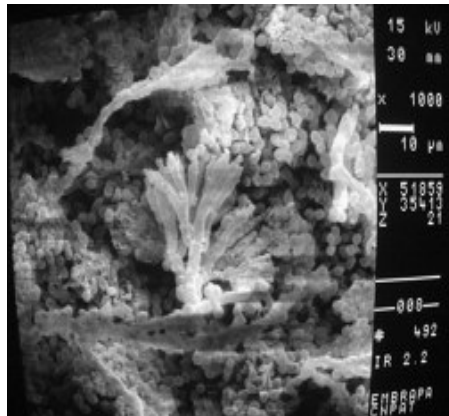


Fig. 3b- Eletromicrografia de *Penicillium* spp.

IR 1(encontrada em:EB)

A macrocolônia apresentou-se aveludada com coloração verde em seu anverso e bordas brancas delimitadas (Fig.4a). Nas eletromicrografias, foi observada a presença de conidióforos (estipes) com ramificações apenas em ramos e raramente em métulas. A ramificação mostrou-se biverticilada, com fiálides cilíndricas e conídios esféricos e lisos (Fig. 4b). Possível identificação como *Penicillium* spp. Link, 1809, dentro do subgênero *Biverticillum*.



Fig. 4a. – *Penicillium* spp em placa de petri.

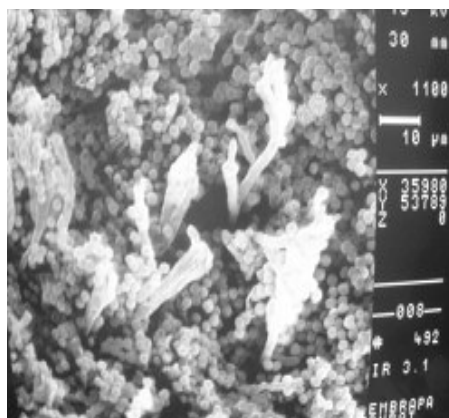


Fig. 4b- Eletromicrografia de *Penicillium* spp.

IR 3.2 (encontrada em:TA)

A macrocolônia apresentou-se em dois tons de coloração, variando de creme a bege-escuro, de aspecto cottonoso, com bordas lisas e limitadas (Fig.5a). Vesícula mostrou-se globosa, com a superfície coberta de fiáldes unisseriadas e conídios globosos, em cobertura radial (Fig.5b). Sugere-se sua identificação como *Aspergillus terreus* (de acordo com KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

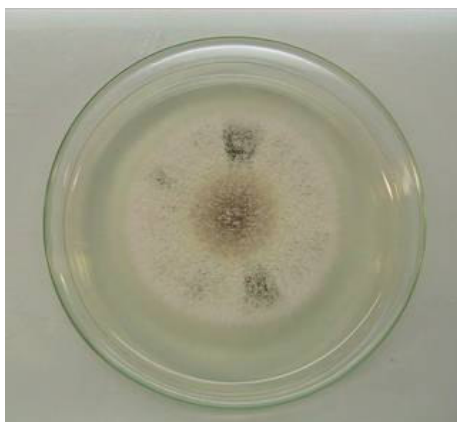


Fig. 5a. – *Aspergillus terreus* em placa de petri.

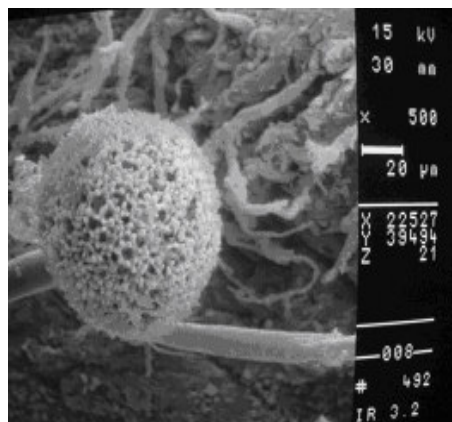


Fig. 5b- Eletromicrografia de *Aspergillus terreus*.

5. CONCLUSÕES

Os fungos identificados do efluente enquadraram-se como hifomicetos, sendo observada à frequência contínua de algumas espécies durante as etapas da unidade de tratamento, indicando que o efluente constitui-se um substrato para o crescimento e sobrevivência dos fungos isolados. Este trabalho de identificação constitui-se em uma etapa preliminar, que visa à utilização dos fungos autóctones como forma de tratamento de efluentes industriais, com baixo custo.

6. REFERÊNCIAS

DOURADO, E. M. C. B. **Análise econômica da viabilidade de variados tamanhos de minifábricas processadoras de castanha de caju no Estado do Ceará.** Fortaleza, 1999. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) – Departamento de Economia Agrícola, Universidade Federal do Ceará.

DUGAN, F.M. The identification of fungi: An illustrated introduction with Keys, Glossary and Guide to Literature. St Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2006. 176p.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 2004, 510 p.

FEITKENHAUER, H.; MULLER, R.; MARKL, H. **Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60°,70°C by Thermus and Bacillus spp.** Biodegradation, vol.14, p.367-372. 2003. vol.22, p.307-313. 2003.

GARCÍA, I. G.; VENCESLADA, J. L. B.; PEÑA, P. R. J.; GÓMES, E.R. **Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum***. *Water research*, v. 31, n.8, p. 2005-2001.1997

GHARSALLAH, N.; LABAT, M.; ALOUI, F.; SAYADI, S. **The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill waster water on anaerobic digestion**. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 27, p. 187-192.1999.

GONZALEZ, G.; HERRERA, G.; GARCIA, M.T.; PENA, M, **Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida***. *Bioresorce Technology*, vol.80, p. 137-142.2001.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Wiley-Liss, New York, 2nd ed. 1994.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA. A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus*. MC7.**Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**,

KITAJIMA, EN. Curso Introductório de Microscopia Eletrônica de Varredura.Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Il Luiz de Queiroz”, Núcleo de Apoio à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA), 1997, 37 p.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São paulo: SARVIER, 1998. 445p.

OLIVEIRA, E.C.; FÉLIX, J.P.L; LEITÃO, R.C. et al. Degradação de fenóis por leveduras presentes em águas residuárias de refinarias de petróleo. In: KATO, M.T. **Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1a coletânea de trabalhos técnicos**. Cap. 10, Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2006.

ROBLES, A.; LUCAS, R.; CIENFUEGOS, G. A. de; GÁLVEZ, A. **Biomasa production and detoxification of wasterwater from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wasterwater disposal ponds**. *Bioresouse Technology*, v. 74, p.217-221. 2000.

SLATER,J.H. Microbial communities in the natural environment. In **The Oil Industry and Microbial Ecosystems**. Eds.K.W. Chater & H.S Somerville, Heyden and Sons,London,pp. 137-154, 1978.

SANTAELLA, S.T. **Avaliação da eficiência da estação de tratamento de esgotos de uma indústria de beneficiamento de castanha de caju**. Relatório de pesquisa. Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. 1996.