

REMOÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO PREDOMINANTES NA ÁGUA RESIDUÁRIA DO CAFÉ POR *ASPERGILLUS BRASILIENSIS* E *PENICILLIUM CITRINUM* EM BIOFILTROS

Aline Ramalho Brandão Pereira¹; Sara Maria Chalfoun²; Cláudio Roberto Fonsêca S. Soares³; Luis Roberto Batista⁴; Manuela da Silva⁵

1- Doutoranda em Microbiologia Agrícola – Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG) aline.uflamg@gmail.com

2- Pesquisadora Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) – Lavras sara.chalfoun.pq@cpq.br

3- Professor Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) crfsoares@gmail.com

4- Professor Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG) luisrp@ufla.br

5- Pesquisadora Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ) manueladasilva@fiocruz.br

RESUMO: A poluição com elementos-traço (metais pesados) tem se tornado um sério problema em muitos países do mundo. A concentração desses elementos nos efluentes agroindustriais frequentemente excede os valores permitidos pela legislação ambiental. O uso das propriedades microbianas de biossorção e bioacumulação de metais tem se tornado uma alternativa aos métodos convencionais de tratamento. Isto porque o tratamento de efluentes contaminados com elementos-traço por microrganismos é extremamente eficaz e economicamente viável na remoção destes elementos, principalmente quando estes estão em baixas concentrações. O uso de fungos isolados de ambientes contaminados na remoção desses elementos tem despertado muito interesse na área de biotecnologia, uma vez que, provavelmente, eles possuem estratégias que permitem que tolerem e removam estes elementos do ambiente. Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar a remoção dos elementos Cu, Mn e Zn, presentes na água residuária do café, pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de ambientes utilizando biofiltros aeróbios. Houve grande remoção de todos os elementos pelos fungos estudados, principalmente pelo fungo *Penicillium citrinum*. Estes resultados indicam que o uso desta espécie fúngica é uma alternativa promissora aos métodos de tratamento convencionais de efluentes contaminados.

Palavras-chave: Remoção; elementos-traço; água residuária do café; fungos.

REMOVAL OF TRACE ELEMENTS IN COFFEE WASTEWATER FOR *ASPERGILLUS BRASILIENSIS* AND *PENICILLIUM CITRINUM* IN BIOFILTERS

ABSTRACT: The pollution with trace elements has become a serious problem in many countries around the world. The trace elements contents in various wastewater often exceed the allowable limits. The use of microbial properties of biosorption and bioaccumulation, has become an alternative to conventional methods of contaminated wastewater treatment with trace elements, since it is an effective method for low concentrations of these elements, and economically feasible. The use of fungi isolated from contaminated environments in the removal of these elements has attracted much interest in biotechnology, because if they can survive in such situations are likely to have strategies that allow it tolerate, and possibly, remove those environmental factors. The aim of this study was to compare the removal of elements Cu, Mn and Zn, present in coffee wastewater by fungi, *Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium citrinum* isolated from environments contaminated by trace elements in flasks and using aerobic biofilters. There was a large removal of all elements by all fungi studied, but *Penicillium citrinum* presented the best results. These results indicate that the use of this fungus specie is a promising alternative to the conventional treatment methods of polluted wastewaters.

Key words: Removal; Trace elements, Coffee Wastewater; fungi.

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, aliado ao desenvolvimento de atividades agropecuárias e industriais, tem produzido diversos efeitos negativos sobre o ambiente. A cafeicultura não foge a essa regra devido a geração de grandes volumes de água (ARC) durante o processamento via úmida.

Dentre os diversos compostos presentes na ARC estão os resíduos provenientes de agrotóxicos e fertilizantes. Estes produtos contêm, em sua composição, várias combinações de elementos-traço (também denominados metais pesados) que, se liberado nos mananciais sem o tratamento adequado, podem acarretar em muitos prejuízos ao ambiente por serem extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos. Isso se deve ao fato desses elementos não possuírem caráter de biodegradação e serem bioacumuláveis, podendo, assim, ser transferidos ao longo da cadeia trófica e comprometer a saúde humana.

Existem uma série de tratamentos convencionais que visam a remoção de elementos traço de águas residuárias como a precipitação química, osmose reversa, oxidação ou redução, troca iônica, filtração, adsorção utilizando carvão ativado e tratamento eletroquímico. Entretanto estes métodos não são eficientes para remoção de elementos-traço quando estão presentes em baixas concentrações, como são encontrados na ARC.

Entre os métodos de tratamento alternativos estudados, um dos mais promissores é a utilização das propriedades de bioacumulação e bioissorção de micro-organismos a estes elementos. Os elementos-traço podem ficar aderidos na superfície da parede celular de tais microrganismos (bioissorção) ou, então, se bioacumularem em organelas ou se ligarem a proteínas de seu interior celular.

Dentre os micro-organismos estudados destaca-se o potencial de fungos filamentosos na remoção de elementos-traço do ambiente, pois tais microrganismos apresentam maior resistência a elementos-traço tóxicos, são mais versáteis em relação à amplitude de substratos que podem usar, e em comparação com leveduras e bactérias, são menos sensíveis a variações de nutrientes, aeração, temperatura e pH.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar a remoção dos elementos cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) presentes na água residuária do café, pelos fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de ambientes contaminados, utilizando biofiltros aeróbios, visando à otimização dos processos de tratamento de águas residuárias contaminadas com estes elementos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados e multiplicação dos inóculos

Foram utilizadas as espécies fúngicas *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum*, ambas isoladas de solos da cidade de Três Marias, MG, contaminados por rejeitos de uma indústria de processamento de Zn.

Coleta de amostra de água residuária do café (ARC): qualificação e quantificação de elementos-traço

Foi coletada uma amostra (200 mL) da água proveniente da lavagem dos frutos do café (ARC), do Centro de Processamento do Café (CEP-café), localizado na UFLA, para a avaliação dos elementos-traço presentes por espectrofotômetro de absorção atômica. Foi feita a avaliação da presença dos seguintes elementos-traço descritos na literatura por Gonçalves (2006), como presentes nas ARC: cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn).

Teste de remoção de elementos-traço em biofiltros aeróbios

Biofiltros

Foram utilizados biofiltros de vidro (reatores de bancada em batelada), previamente desinfetados com uma solução de formaldeído a 10%, com 20 mm de espessura, prismáticos, com 65 cm de altura e 15 cm de lado e capacidade de 14,6 litros, previamente construídos por Silva (2008). Ao longo da altura dos reatores, foram instaladas quatro torneiras, para permitir a amostragem do efluente para as análises de quantificação dos elementos-traço. O biofiltro foi continuamente oxigenado com o auxílio de uma bomba de ar aquática BOYU modelo U-3600, com vazão de 4,0 L min⁻¹.

Inoculação dos fungos isolados de região contaminada em material suporte e ativação dos biofiltros

O meio suporte conduíte foi escolhido, pois, após a realização de testes com este material, por Silva (2008), concluiu-se que este tem baixo custo, pode ser reaproveitado várias vezes após sucessivos testes em biofiltros, além de não alterar o pH nem a turbidez da solução em que está inserido.

Os isolados fúngicos de região contaminada por elementos-traço foram repicados em placas contendo o meio ágar malte (MA) e incubados, por 20 dias, a 25°C. Após esse período, foram adicionados 20 mL de água destilada estéril na superfície das mesmas, e feita uma raspagem da biomassa desenvolvida na superfície, para a desagregação dos esporos. Os esporos presentes na suspensão foram contados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para, aproximadamente, 5x10⁶ esporos mL⁻¹.

A suspensão de esporos (20 mL) foi inoculada em frascos contendo 250 mL de meio MA ainda fundido (40°C), homogeneizada e transferida para bandejas contendo o suporte para o crescimento fúngico. O suporte consiste de tubos corrugados (1,5 cm de diâmetro/2 cm comprimento – 8 L de conduíte por biofiltro), previamente esterilizados em autoclave, a 121°C, por 15 minutos. As bandejas foram encobertas por plástico filme e incubadas, a 25°C, por vinte dias, para que os fungos crescessem e colonizassem a superfície e interior do conduíte.

Após esse período, o material suporte contendo a biomassa fúngica aderida foi transferido para o biofiltro e, em seguida, adicionados dez litros de uma solução sintética contendo água destilada, acrescida de sulfato de cobre, sulfato de manganês e sulfato de zinco, simultaneamente, a uma concentração de 5 mg/L de Cu, Mn e Zn. O pH da solução foi alterado para pH6,0, pois este pH é descrito por alguns autores (SAY et al., 2001) como ideal para a remoção de alguns dos elementos testados.

O biofiltro foi ativado, 20 mL de cada torneira foram retirados, inicialmente de 12 em 12 horas e, após dois dias, diariamente por um período de cinco dias. A concentração dos elementos-traço presentes nas amostras foi avaliada por espectrofotometria de absorção atômica.

Foi feita a análise estatística dos dados obtidos referentes à remoção dos elementos-traço por estes dois fungos utilizados utilizando o software SISVAR. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema

fatorial, com 2 fatores: tempo (12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas) e fungo em cada elemento-traço, com um total de 4 repetições por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos elementos-traço presentes na ARC

Na Tabela 11 são apresentados os resultados das concentrações dos elementos-traço Cu, Mn e Zn presentes na ARC obtida do CEP-Café, na UFLA.

Tabela 11: Resultado das concentrações dos metais Cu, Mn e Zn presentes na água residuária do café obtida do CEP-Café (UFLA).

Elementos traço presente na ARC	Concentração obtida por espectrofotometria de absorção atômica	COPAM	CONAMA
Cobre	<1 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L
Manganês	<0,5 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Zinco	0,36 mg/L	5,0 mg/L	5,0 mg/L

As concentrações obtidas na amostra de água proveniente da lavagem do café do CEPE-Café estão abaixo da concentração permitida pelo COPAM e CONAMA. Entretanto, nos estudos realizados por Vasco (1999) e Gonçalves (2006), referentes à presença de elementos traço na ARC, as concentrações destes elementos-traço estavam muito acima do permitido por estes órgãos fiscalizadores. Foram encontradas as seguintes concentrações por estes autores: 5 mg/L Cu, 4 mg/L Zn (Vasco, 1999) 1,27 mg/L Cu, 1,33 mg/L Mn e 0,66 mg/L de Zn (Gonçalves, 2006).

Teste de remoção de elementos-traço em biofiltros aeróbios

Nas Tabelas 26 a 29 são apresentados os resultados do pH e concentração residual de elementos-traço após cultivo com os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de regiões contaminadas, em biofiltros aeróbios, após sete dias de ativação.

Tabela 26: Média do pH em biofiltros utilizando conduítes como meio suporte para o crescimento de *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos.

VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil

Ph	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	6	5,2	5,0	5,9	6,6	6,9	7,1	7,0
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	6	3,0	3,0	3,1	3,1	3,1	3,1	3,2

Biofiltro A: Fungo *Penicillium citrinum* inoculado em conduítes e solução sintética contendo 5 mg/L dos elementos-traço Cu, Mn e Zn, em pH inicial 6.

Biofiltro B: Fungo *Aspergillus brasiliensis* inoculado em conduítes, com solução sintética contendo 5 mg/L dos elementos-traço Cu, Mn e Zn, e pH inicial 6.

Pode-se observar, após a análise dos dados da Tabela 26, que o pH do biofiltro inoculado com *Penicillium citrinum* (biofiltro A) apresentou uma queda de um ponto (5) em relação ao inicial (6), até 24 horas de ativação, seguido de um aumento para pH 7 com 120 horas de ativação. Com relação ao biofiltro B (inoculado com *Aspergillus brasiliensis*), foi observada uma queda de três pontos em relação ao inicial (pH 6 para pH 3), após 6 horas de ativação e manutenção deste valor de pH após 120 horas de ativação.

A diminuição do pH observada no experimento realizado com o fungo *A. brasiliensis* deve ter ocorrido devido à produção de ácidos por esse fungo, pois, segundo Varga et al. (2007), é muito próxima à espécie *Aspergillus niger*, que é produtora de ácido glucônico e cítrico.

Mulligan, Galvez-Cloutier e Renaud (1999) observaram que, após dez dias de incubação com o fungo *A. Níger*, o pH reduziu a 3, provavelmente pela produção de ácido que auxilia na remoção de elementos-traço do ambiente.

Tabela 27: Média da concentração do elemento-traço Cu em biofiltro utilizando tubo corrugado como meio suporte para *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos.

Cu	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	5,000	4,564	4,343	3,462	3,093	6,130	6,251	4,564
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	5,000	4,626	4,383	3,468	3,102	6,170	6,237	4,626

Tabela 28: Média da concentração do elemento-traço Mn em biofiltro utilizando tubo corrugado como meio suporte para *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos.

Mn	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	5,000	2,686	2,526	2,466	2,354	2,360	2,278	2,686
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	5,000	3,106	3,116	3,143	3,112	3,153	3,057	3,106

Tabela 29: Média da concentração do elemento-traço Zn em biofiltro utilizando tubo corrugado como meio suporte para *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada por estes elementos.

Zn	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h
BIOFILTRO A <i>P. citrinum</i>	5,000	3,315	2,749	2,436	2,388	2,250	2,428	3,315
BIOFILTRO B <i>A. brasiliensis</i>	5,000	3,585	3,528	3,738	3,680	3,178	3,478	3,585

Foi feita a análise de variância para variável resposta remoção de cobre por *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium citrinum* isolados de região contaminada. O teste F, a 5% de significância, foi significativo para a interação dupla fungo x tempo. Logo, se procedeu ao desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de tempo (Tabela 31).

Tabela 31: Teste de médias para o desdobramento do fator fungo dentro dos níveis de tempo (12 a 120 horas) para o elemento cobre.

Tempo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<i>P. citrinum</i>	5,58 a	5,19 A	4,69 a	4,42 a	3,47 a	3,11 a
<i>A. brasiliensis</i>	6,21 b	6,22 B	6,20 b	6,16 b	6,12 b	6,06 b

Letras seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Por meio da análise da Tabela 31, observa-se que o fungo *P. citrinum* foi o que apresentou os melhores resultados na remoção do elemento Cu, em todos os tempos avaliados. Fez-se a análise de variância para variável resposta remoção de manganês por ambos os fungos estudados. O teste F, a 5% de significância, não foi significativo para a interação dupla Fungo X Tempo. Logo, procedeu-se à análise individual do fator tempo e do fator fungo (Tabela 33). Ambos foram significativos, pelo teste F, a 5% de significância.

Tabela 33: Teste de médias para o fator fungo, para o elemento manganês.

<i>P. citrinum</i>	1,87 a
<i>A. brasiliensis</i>	2,45 b

Letras seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Pela análise da Tabela 33, constata-se que o fungo *P. citrinum* apresentou os melhores resultados na remoção do elemento-traço manganês.

Também foi feita a análise de variância para variável resposta remoção de zinco por ambos os fungos estudados. O teste F, a 5% de significância, não foi significativo para a interação dupla fungo X tempo. Logo, procedeu-se à análise individual do fator tempo e do fator fungo (Tabela 35). Ambos foram significativos, pelo teste F, a 5% de

significância.

Tabela 36: Teste de médias para o fator fungo, para o elemento zinco.

<i>P. citrinum</i>	2,59	a
<i>A. brasiliensis</i>	3,53	b

Letras seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Pela análise da Tabela 36, observa-se que o fungo *P. citrinum* apresentou os melhores resultados na remoção do elemento-traço zinco.

Pode-se concluir que, durante todo o experimento, o fungo *Penicillium citrinum* removeu com maior eficiência a maioria dos elemento-traço estudados, quando comparado ao fungo *Aspergillus brasiliensis*. Provavelmente, os elementos-traço estudados são sensíveis à variação de pH como a que ocorreu no biofiltro inoculado com o fungo *Aspergillus brasiliensis*.

O mesmo fenômeno foi observado por Leitão (2009), na captação de Zn^{+2} por *P. digitatum*. Neste estudo, a remoção de Zn mostrou-se altamente sensível a variações no pH, sendo inibida em pH abaixo de 3. Em outro estudo, avaliou-se a biossorção de Cu^{+2} por *Penicillium cyclopium*. A remoção foi considerada fortemente dependente do pH, da quantidade de biomassa e da concentração de íons Cu nas soluções. O processo de biossorção foi rápido e, nos primeiros cinco minutos, até 75% do total de íons Cu foram depositados na superfície do fungo em estudo (IANIS; TSEKOVA; VASILEVA, 2006).

Say et al. (2001) estudaram o efeito do pH na biossorção de Cd, Pb e Cu por *Phanerochaete chrysosporium*. Segundo estes autores, o pH do meio afeta a solubilidade dos metais e o estado de ionização dos grupos funcionais (carboxilato, fosfato e grupamento amino) presentes na parede celular fúngica. Os grupos carboxilatos e fosfatos possuem carga negativa que permitem que estes componentes sejam importantes sítios de ligação de cátions. Assim, em pH próximo a 6, estes pesquisadores obtiveram maior adsorção destes elementos em estudo ao fungo. Foi encontrada uma remoção de 13,24 mg de Cd, 45,25 mg de Pd e 10,72 mg de Cu, por grama de biomassa seca.

CONCLUSÕES

Ambas as espécies estudadas apresentaram alta capacidade de remoção dos elementos-traço em estudo (Cu, Mn e Zn), entretanto *Penicillium citrinum* apresentou maior capacidade de remoção em relação a *Aspergillus brasiliensis*. Assim, estes resultados indicam que este fungo é um potente candidato para o tratamento de efluentes agroindustriais que possuem baixas concentrações de elementos-traço, como é o caso da água residuária do café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 53, de 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- GONÇALVES, M. **Caracterização e oxidação dos compostos orgânicos nas águas residuárias da despolpa úmida dos frutos do cafeeiro**. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- IANIS, M.; TSEKOVA, K.; VASILEVA, S. Copper biosorption by *Penicillium cyclopium*: equilibrium and modelling study. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 20, n. 1, p.195-201, Jan. 2006.
- KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D. R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus nidulans*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n.1, p.95-104, Apr. 1999.
- LEITÃO, A. L. Potential of penicillium species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 6, n. 4, p.1393-1417, 2009.
- LOURENÇO, A. M. P. **Desempenho de um sistema composto de reator UASB, filtro anaeróbio e lagoa aerada facultativa para o tratamento das águas residuárias da suinocultura**. 2006. 129 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- MINAS GERAIS. Deliberação Normativa nº. 10, de 16 de dezembro de 1986. Estabelece normas e padrões para qualidade das águas, lançamentos de afluentes nas coleções de águas, e dá outras providências. **Minas Gerais: diário executivo**, Belo Horizonte, 10 jan. 1987. Disponível em: <http://www.paas.uff.br/legisla/copam10_86.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2011.
- MULLIGAN, C. N.; GALVEZ-CLOUTIERB, R.; RENAUBD, N. Biological leaching of copper mine residues by *Aspergillus Níger*. In: INTERNATIONAL BIOHYDROMETALLURGY SYMPOSIUM, 13., 1999, San Lorenzo del Escorial. **Proceedings...**Amsterdam: Elsevier, 1999.

- SILVA J. F. **Desenvolvimento de biofiltro para avaliar a capacidade de biossorção de cobre pelo fungo *Cladosporium cladosporioides***. 2008. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- SAY, R.; DENIZLI, A.; YAKUP, A. M. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 76, n.1, p. 67-70, 2001.
- TSEKOVA, K.; TODOROVA, D.; GANEVA, S. Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 1, p. 1780-1787, Jan. 2006.
- VARGA, J. et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 8, p. 1925-1932, Aug. 2007.
- VASCO, E. Z. Procesamiento de frutos do café por via humeda y generación de subproductos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: UFRP/IAPAR/IRD, 1999. p. 345-355.