



SETAC - Brazil

## Toxicidade de Resíduos Têxteis Tratados por Microrganismos

P. M. DELLAMATRICE & R. T. R. MONTEIRO\*

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Laboratório de Ecotoxicologia, C.P. 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

### RESUMO

A biodegradação do efluente e resíduo sólido da Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Americana, SP (DAE Americana), a qual trata 400 L s<sup>-1</sup> de esgoto municipal junto com efluentes de 43 indústrias têxteis, foi estudada utilizando diversos microrganismos, como cianobactérias e fungos basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, e também em sistema anaeróbio. A toxicidade foi determinada utilizando como bioindicadores *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum* e sementes de alface (*Lactuca sativa*). A degradação do efluente foi eficiente para descoloração e toxicidade. A descoloração do resíduo sólido foi possível utilizando os fungos, entretanto, a toxicidade aumentou, mostrando que a degradação deve ser estimulada por mais tempo ou é necessário o uso de outros organismos ou outras metodologias. A quantidade de enzimas lacase e manganês peroxidase produzida variou na presença do efluente ou do lodo. O tratamento anaeróbio/aeróbio mostrou-se o mais eficiente para a degradação do efluente, sendo a cor removida durante o processo anaeróbio e a toxicidade reduzida após o tratamento aeróbio.

*Palavras-chave:* biodegradação, efluente têxtil, lodo, resíduos sólidos, bioensaios, *Hydra attenuata*, *Lactuca sativa*, *Selenastrum capricornutum*.

### ABSTRACT

#### Textile effluent toxicity after treatment by microorganisms

The Municipal Treatment Station of Americana, São Paulo, Brazil, manages 400 L s<sup>-1</sup> of effluent, from domestic and textile origin, which produces an average of 20 t of sludge per day. The degradation of the effluent and sludge by cyanobacteria, by fungus *Pleurotus*, and anaerobic system was evaluated after an activated sludge treatment. The detoxification was appraised with three bioassays comprising the cnidarian *Hydra attenuata*, the alga *Selenastrum capricornutum* and lettuce seeds. All the microorganisms were able to degrade and detoxify the effluent. The strains of *Pleurotus* were able to decolorized the sludge, however the toxicity increased. The three strains produced high amounts of manganese-peroxidase and laccase in the presence of the effluent or sludge. The anaerobic/aerobic treatment was the most efficient for degradation of the effluent and reducing its toxicity.

*Key words:* biodegradation, textile effluent, sludge, dye, decolorization, bioassay, *Hydra attenuata*, *Lactuca sativa*, *Selenastrum capricornutum*.

### INTRODUÇÃO

As indústrias têxteis geram grande quantidade de resíduos com baixos níveis de degradação, incluindo os corantes utilizados no processo, conseqüentemente, há dificuldade de tratamento e disposição final desses resíduos. Cerca de 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos no efluente. A degradação por microrganismos tem tido sucesso em alguns casos, porém, a baixa degradabilidade desses compostos tem resultado em níveis de degradação não satisfatórios, inclusive

em sistemas de lodo ativado. Nesses sistemas, grande quantidade de resíduo sólido é formada, contendo ainda grande parte dos corantes adsorvidos que são descartados em aterros industriais, sendo este outro problema ambiental.

O objetivo deste trabalho foi estudar a degradação por vários microrganismos em termos de descoloração e toxicidade, buscando uma tecnologia mais eficiente na degradação dos resíduos de efluente da Estação de Tratamento de Esgoto Municipal de Americana, SP, que contém efluentes de indústrias têxteis.

\*Corresponding author: Regina T. R. Monteiro, e-mail: monteiro@cena.usp.br.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados o efluente e resíduo sólido da Estação de Tratamento de Esgoto de Americana (ETE-DAE/Americana, SP), os quais são resultantes do tratamento do efluente municipal por lodo ativado e contêm mistura de ¼ de esgoto doméstico e ¾ oriundos de 43 indústrias têxteis diferentes, sendo os corantes pertencentes à classe das antraquinonas e indigóides.

Os microrganismos foram os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus*, duas linhagens de *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 (F2) e PSC 94/03 (F6) e as cianobactérias *Anabaena flos-aquae*, *Phormidium autumnale* e *Synechococcus* sp. PCC. A degradação do efluente em meio anaeróbico e anaeróbico + aeróbico também foi estudada.

O inóculo fúngico foi preparado em meio malte-ágar (2% malte e 0,2% extrato de levedura) incubado a 28°C durante oito dias. Frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 3,5 g de bagaço de cana e 1,5 g de farelo de trigo foram inoculados com três discos de 5 mm de diâmetro da cultura. Após 12 dias de incubação, metade dos frascos foi inativada em estufa a 55°C, com a finalidade de verificar se a descoloração seria devido à adsorção ao micélio ou à degradação. Em seguida, 30 ml de efluente foram aplicados sobre os fungos ativos e inativos. Os frascos foram então incubados por duas semanas e analisados. As cianobactérias foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de efluente. Para o tratamento anaeróbico frascos de 150 ml, totalmente preenchidos, foram fechados com tampa de borracha e selados com fita de alumínio em atmosfera de CO<sub>2</sub> e incubados por 15 dias. Posteriormente, os frascos foram abertos para aeração e incubados por mais 15 dias.

O lodo residual misturado a bagaço de cana (5:1, v/v) foi inoculado com as três linhagens de *Pleurotus*. Após 30 dias foram analisados e a atividade das enzimas ligninolíticas manganês peroxidase e lacase foram medidas segundo metodologia de Kuwahara *et al.* (1984) e Szklarz *et al.* (1989).

A toxicidade do efluente foi avaliada utilizando como bioindicadores os organismos *Hydra attenuata*, a alga *Selenastrum capricornutum* e sementes de alface (*Lactuca sativa*).

*Hydra attenuata*: As amostras foram preparadas adicionando-se 14,7 mg de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 11 mg de tampão TES para 100 ml de amostra e ajustando-se o pH para 7,0 ± 0,1. As amostras foram filtradas a 0,22 µm para evitar crescimento microbiano e diluídas para 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; e 1,56% em meio para *Hydra* (Trottier *et al.*, 1997) e somente meio para controle. Quando não permitiram filtração, as amostras foram diluídas para a filtração. Foram utilizadas placas de poliestireno contendo 12 “pocinhos” (3 repetições × 4 concentrações) onde foram colocados 4 ml de amostra e 3 organismos por repetição. As alterações na morfologia (doses subletais) e morte das *Hydras* são avaliadas após 24, 48, 72

e 96 h de exposição, e os valores de NOEC (maior concentração sem efeito sobre o organismo) e LOEC (menor concentração que apresentou efeito sobre o organismo) foram calculados.

*Selenastrum capricornutum*: Foram utilizados 5 controles e 3 repetições das diluições 100; 50; 25; 12,5; e 6,25% da amostra filtrada a 0,22 µm em 2,5 ml de meio (Blaise *et al.*, 2000). Quando não foi possível a filtração a 0,22 µm do efluente, foram utilizadas diluições maiores. Prepararam-se 20 ml de uma solução de inóculo contendo 2,6.10<sup>5</sup> cel./ml de maneira que fossem adicionadas 10.000 células para cada repetição. As amostras foram incubadas por 72 h a 24°C sob constante iluminação (4000 ± 10% lux). Foram feitas contagens do número final de algas e os valores da LC<sub>50</sub>, que é a concentração que apresenta efeito sobre 50% dos indivíduos analisados, foram determinados.

Alface (*Lactuca sativa*): São colocadas 20 sementes de alface sobre papel de filtro Whatman n.1 em placa de poliestireno (Ø = 9 cm) embebida em 2 ml de cada diluição da amostra (100; 50; 25; 12,5; e 6,25%) filtrada em membrana Millipore 0,22 µm. As amostras são incubadas envoltas por papel de alumínio e após 72 h avaliam-se a germinação das sementes e o comprimento das radículas para o cálculo da LC<sub>50</sub> (Dutka, 1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cianobactérias *Anabaena*, *Phormidium* e *Synechococcus* foram capazes de descolorir o efluente, 24, 28 e 2%, respectivamente. Considerando que houve um efeito da cor verde das culturas, nas leituras, a descoloração foi maior do que a determinada pela metodologia empregada. Esse efeito foi mais pronunciado para a cianobactéria *Synechococcus*. A descoloração em meio anaeróbico e anaeróbico + aeróbico foi total. Isso indica a presença no efluente de organismos capazes de reduzir anaerobicamente as moléculas, com quebra do grupo cromóforo.

O tratamento do efluente com as cianobactérias foi capaz de reduzir a toxicidade em relação ao efluente-controle, para *H. attenuata* (Tabela 1). O controle incubado no escuro apresentou efeito tóxico ligeiramente maior que o controle na luz, indicando que a fotodegradação, embora pouco significativa, foi suficiente para reduzir a toxicidade. Foi encontrada inibição para o crescimento das radículas de alface somente para o controle escuro. No teste com alga não foi encontrada toxicidade.

As amostras de efluente tratadas com *Pleurotus* mostraram aumento nos valores de NOEC e LOEC para *H. attenuata*, indicando redução na toxicidade após o tratamento (Tabela 1). As linhagens inativadas mostraram menor redução no efeito tóxico, indicando adsorção dos corantes ao micélio, porém este não é o principal processo envolvido. No teste de germinação de sementes houve redução na toxicidade sobre o crescimento das radículas para as linhagens ativas de *Pleurotus*, mas não

para as inativadas. No teste com alga não foi detectada toxicidade em nenhum dos tratamentos.

Em meio anaeróbio, no teste com *H. attenuata* não foram detectadas diferenças na toxicidade antes e após o tratamento, mostrando que, embora não tenha havido redução na toxicidade, a degradação do efluente não resultou em formação de metabólitos mais tóxicos que a molécula original. Quando, após o tratamento anaeróbio, os frascos foram reaerados houve redução na toxicidade com relação ao controle (Tabela 1). A mesma tendência foi verificada no teste com a alga *S. capricornutum*, em que foram obtidos valores parecidos para a  $IC_{50}$  para o controle e tratamento anaeróbio, 73 e 70%, respectivamente, enquanto para o tratamento anaeróbio + aeróbio a toxicidade foi bastante reduzida. No teste de sementes não foi detectada toxicidade.

#### Descoloração e toxicidade do lodo por *Pleurotus*

As linhagens de *P. sajor-caju* F2 e F6 foram mais eficientes para descolorir o lodo do que *P. ostreatus*, após 30 dias de incubação. Houve aumento de toxicidade após o tratamento do lodo com as linhagens de *Pleurotus* sobre o organismo *H. attenuata*. A linhagem *P. sajor-caju* F6 foi o tratamento que

apresentou maior toxicidade. O lodo pode conter maior quantidade de corantes hidrofóbicos e insolúveis que são removidos do efluente, durante a decantação, de difícil degradação.

No teste com a alga *S. capricornutum* houve inibição somente na concentração de 100% do efluente, que foi de 32% para o controle, 40% para *P. sajor-caju* F6 e 11% para *P. ostreatus*. Para *P. sajor-caju* F2 não foi detectada inibição em nenhuma concentração. O teste de germinação e crescimento das radículas de alface mostrou redução na  $IC_{50}$  para todos os tratamentos com relação ao controle,  $IC_{50} = 97$ , o que significa aumento na toxicidade,  $IC_{50}$  para F2 = 41 e  $IC_{50}$  para F6 = 88.

A atividade enzimática foi maior na presença do lodo comparada com a do efluente (Tabela 2), entretanto, não teve correlação com a descoloração do lodo pelas linhagens. *P. sajor-caju* F2 foi o mais eficiente na descoloração do lodo e produziu manganês peroxidase em quantidade similar à de lacase (ao redor de 2,6 U), enquanto *P. ostreatus*, embora tenha sido menos eficiente na descoloração, produziu elevada quantidade de lacase (8,0 U) e manganês peroxidase (3,7 U), indicando que a presença de enzimas pode não ser o único fator envolvido na descoloração.

**Tabela 1** — Valores de NOEC e LOEC para *Hydra* e  $IC_{50}$  para *L. sativa* para o efluente tratado com linhagens de cianobactérias, *Pleurotus* e sistema aeróbio/anaeróbio.

| Tratamentos                     | <i>Hydra</i> |       | Sementes  |
|---------------------------------|--------------|-------|-----------|
|                                 | NOEC         | LOEC  | $IC_{50}$ |
| Controle escuro                 | 6,25         | 12,5  | 94,98     |
| Controle luz                    | 12,5         | 25    | 0         |
| <i>Anabaena</i>                 | 25           | 50    | 0         |
| <i>Phormidium</i>               | 50           | —     | 0         |
| <i>Synechococcus</i>            | 25           | 50    | 0         |
| Controle                        | 1,56         | 3,125 | 53,69     |
| <i>P. sajor-caju</i> F2 ativo   | 12,5         | 25    | 0         |
| <i>P. sajor-caju</i> F2 inativo | 6,25         | 12,5  | 52,13     |
| <i>P. sajor-caju</i> F6 ativo   | 12,5         | 25    | 0         |
| <i>P. sajor-caju</i> F6 inativo | 6,25         | 12,5  | 66,35     |
| <i>P. ostreatus</i> ativo       | 12,5         | 25    | 0         |
| <i>P. ostreatus</i> inativo     | 3,125        | 6,25  | 62,73     |
| Controle                        | 12,5         | 25    | 73,35     |
| Anaeróbio                       | 12,5         | 25    | 70,39     |
| Aeróbio + anaeróbio             | 50           | 100   | 0         |

**Tabela 2** — Atividade das enzimas manganês peroxidase e lacase dos fungos na presença do efluente e lodo.

| Tratamentos             | Efluente            |        | Lodo                |        |
|-------------------------|---------------------|--------|---------------------|--------|
|                         | Manganês peroxidase | Lacase | Manganês peroxidase | Lacase |
| Controle                | 0                   | 0      | 0                   | 0      |
| <i>P. sajor-caju</i> F2 | 0,31196             | 0,5239 | 2,3617              | 0,293  |
| <i>P. sajor-caju</i> F6 | 0,39572             | 2,2427 | 2,7653              | 2,555  |
| <i>P. ostreatus</i>     | 0,75384             | 0,0264 | 3,7219              | 8,008  |

## CONCLUSÃO

Os estudos mostraram que os organismos foram eficientes no tratamento do efluente quanto à descoloração e toxicidade. O lodo descoloriu, entretanto apresentou aumento na toxicidade após o tratamento, indicando a necessidade de combinação com outros tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. B., 1968, Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.*, 4: 1-4.
- ALLEN, M. M. & ARNON, D. I., 1955, Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I – Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology*, 30: 366-372.
- BLAISE, C., FORGET, G. & TROTTIER, S., 2000, Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-H exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Technical Methods*, 15(4): 352-359.
- DIELS, L., 1997, Heavy metal bioremediation of soil. In: Sheehan, D. *Bioremediation protocols*. Ed. Humana Press, v. 2, 339p.
- DUTKA, B., 1989, *Short-term root elongation toxicity bioassay*. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.
- KUWAHARA, 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 lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letter*, 169: 247-250.
- SZKLARZ, G., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L. & LINKINS, A. E., 1989, Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, 81: 234-240.
- TROTTIER, S., BLAISE, C., KUSIN, T. & JOHNSON, E. M., 1997, Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Technical Methods*, pp. 265-271.