

REVISTA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

VOLUME XXI

NÚMEROS 1-2-3 e 4

Jan.-Dez. 1998

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA
DIRECÇÃO REGIONAL DE AGRICULTURA DE TRÁS-OS-MONTES
UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
UNIVERSIDADE DE ÉVORA

I SIMPÓSIO NACIONAL DE OLIVICULTURA

15-18 DE SETEMBRO DE 1998
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA

EDIÇÃO ESPECIAL

SOCIEDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE PORTUGAL

Fundada em 1903

Lisboa

VIABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA DEPURAÇÃO DE ÁGUAS RUSSAS

POR

LUÍS CUNHA SANTOS ¹

ABSTRACT

The olive mill wastewaters are a severe environmental problem because of their high organic content and the presence of phenol. Some tests are made with yeasts and molds from olive mill wastewater, in the presence of phenol. The results are discussed in this paper.

1. INTRODUÇÃO

Desde sempre o azeite em Portugal tem uma grande importância nos planos cultural, religioso e social (Gouveia, 1995).

No plano económico, embora grande, a importância do azeite em Portugal tem diminuído, já que, de acordo com dados do Conselho Oleícola Internacional — COI — (cit. por Madureira *et al.*, 1994), o nosso passou de 6.º produtor mundial para 7.º ou mesmo 8.º (ultrapassado pela Síria e nalguns anos por Marrocos).

Contudo, ainda hoje o sector olivícola tem importância na agricultura nacional, sendo responsável pela ocupação de 8,8% da Superfície Agrícola Útil e de 44% da SAU ocupada por culturas permanentes (INE, 1993), estando presente em quase 31% das explorações agrícolas e representando 5,8% do PAB do Continente (Soares, 1990; Madureira, 1992).

Apesar do decréscimo de produção e consumo nacionais verificados de 1970/71 a 1989/90, de -24,0% e -26,1%, respectivamente (Soares, *ob. cit.*; Madureira, *ob. cit.*), a situação a nível produtivo nos anos 90 começou a recuperar do nível a que se havia dei-

¹ Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico, Bragança.

xado cair, ao ponto de Portugal ter sido o único país em que a produção baixou desde o pós-guerra (ainda por cima cerca de 50%), fruto do desinteresse e abandono do olival nos anos 70 e princípios de 80 (Santos, 1998).

O futuro do sector apresenta-se promissor, dadas as boas perspectivas de expansão do produto em novos mercados, sem recuo nos tradicionais, fruto do reconhecimento do seu elevado valor dietético e dos benefícios para a saúde (Soares, ob. cit.).

Para que se confirmem estas expectativas do sector olivícola nacional, terá de se por-fiar por uma política de melhoria de produtividade e de eficiência técnica, e por uma política de qualidade, com vista a potenciar nos exigentes mercados consumidores a colocação de um produto com procura assegurada, produzido em regiões com denominação de origem protegida, cuja criação já foi legalmente consagrada.

O esforço que está sendo feito nesse sentido, pode no entanto, a prazo, ser inútil se não for salvaguardada a resolução eficaz da problemática dos efluentes dos lagares de azeite, designados de águas russas.

2. O PROBLEMA DAS ÁGUAS RUSSAS

As águas russas dos lagares de azeite constituem actualmente um sério problema ambiental e económico-social.

O problema ambiental posto pelas águas russas deve-se a duas ordens de razões: elevada carga poluente, traduzida em valores de CBO_5 da ordem de $90\text{-}100\text{gL}^{-1}$ e $35\text{-}48\text{gL}^{-1}$ e de CQO de $120\text{-}130\text{gL}^{-1}$ e $45\text{-}60\text{gL}^{-1}$, em qualquer dos parâmetros, para processos contínuos e descontínuos, respectivamente (Ursinos e Padilla, 1992), muito superiores aos máximos permitidos pelo Decreto-Lei n.º 74/90 para descarga de águas residuais em cursos de água — CQO de 150mgL^{-1} e CBO_5 de 40mgL^{-1} ; dificuldade de biodegradação, devido à presença na água russa de compostos fenólicos em elevados teores, de $10\text{-}24\text{gL}^{-1}$ (Padilla *et al.*, 1990).

A necessidade de dar eficaz cumprimento à legislação ambiental, suscitada pela pressão de uma opinião pública cada vez mais consciente da problemática ecológica, pode constituir uma severa limitação à actividade dos lagareiros, sobretudo em lagares tradicionais de pequena dimensão, aos quais, devido à sua reduzida escala, são praticamente inaplicáveis a generalidade dos processos de tratamento mais divulgados.

Tais lagares, concentrados essencialmente nas regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro e da Beira Interior, cumprem uma importante função social nas comunidades rurais onde estão instalados, pelo que a possibilidade de o seu funcionamento poder ser posto em causa suscita nestas motivos de apreensão.

Devem, pois, ser equacionadas hipóteses de tratamento economicamente aplicáveis a instalações em pequena escala, como as que se nos afiguram ser possibilitadas pela via biológica, e desenvolver a investigação necessária para ajudar a que se tornem viáveis.

3. UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS — BREVE REFERÊNCIA À INVESTIGAÇÃO DESENVOLVIDA

Conforme referem Ursinos e Padilla (1992), a fracção fenólica das águas russas pode sofrer degradação por microrganismos.

Os estudos de toxicidade e biodegradabilidade efectuados mostraram, em relação à fracção fenólica, que os componentes polifenólicos, que comunicam a côr escura às águas russas, não são facilmente biodegradáveis, mas também não são tóxicos. A toxicidade provém dos compostos fenólicos simples, dos taninos e dos ácidos gordos de cadeia longa presentes neste efluente (Hamdi, 1992; Rosa e Vieira, 1995).

Faz, assim, sentido, em teoria, pensar num tratamento diferenciado, por forma a ultrapassar o problema da toxicidade e, subsequentemente, depurar o efluente.

Nesta conformidade, Hamdi *et al.* (1992) testaram um sistema de tratamento integrado, em três etapas sequenciais, que, mercê de reduções sucessivas sempre muito significativas, conduziram a um abaixamento global de mais de 90% do COD do efluente: tratamento aeróbio com o fungo *Aspergillus niger*, para destoxificação das águas russas por degradação dos componentes causadores da toxicidade, com produção de biomassa e retenção dos sólidos suspensos do efluente pelo micélio; tratamento anaeróbio de metanização da fracção líquida remanescente, com bom rendimento em biogás; tratamento aeróbio do remanescente em reactor de lamas activadas, com bagaço de azeitona em leito fluidizado por arejamento, dando origem a produção de lamas superior a 2gdm^{-3} e manutenção da côr escura comunicada por polifenóis.

Padilla *et al.* (1992) referem resultados experimentais interessantes, em resultado de um pré-tratamento aeróbio de 3 dias de água russa de um sistema clássico de extracção com uma estirpe de *Geotrichum candidum* isolada do próprio efluente, com quebras, em percentagem (p/v), de 50% de CQO, 42% de fenóis totais e 50% de ortodifenóis.

Contudo, já Hamdi (1991) havia alertado para o facto de a digestão anaeróbia de água russa só poder ser levada a cabo com a maior eficácia em substracto diluído, devido à presença de componentes tóxicos para as bactérias metanogénicas. Daí que Padilla *et al.* (ob. cit.) no seu trabalho tivessem testado diversas diluições de água russa, entre 0 e 5 vezes, para a fase anaeróbia, tendo observado reduções de COD nesta etapa que chegavam a 80% nos substractos mais diluídos mas menos significativas nos mais concentrados.

Borja *et al.* (1995) observam reduções consideráveis no COD e nos teores de fenóis totais das águas russas após ensaios de pré-tratamento com *Geotrichum candidum* 5 dias a 25°C , *Azotobacter chroococcum* 48 H a 30°C e *Aspergillus terreus* 72 H a 28°C .

Parece-nos, no entanto, que a componente anaeróbia do tratamento dificilmente será aplicável em lagares de pequena dimensão, salvo se estiverem integrados em explorações agrícolas de maior envergadura, dado o investimento exigido em reactores de produção de biogás e a necessidade de adequado acompanhamento técnico da metanogénese.

Contudo, pode-se equacionar a possibilidade de tratamentos exclusivamente aeróbios, porventura menos onerosos, usando estirpes de espécies como as acima referidas.

Hamdi *et al.* (1991) referem reduções de 61% de COD e de 58% dos fenóis totais na sequência do uso de *Aspergillus niger*.

Aspergillus niger não degrada, contudo, os polifenóis de elevado peso molecular (Sayadi e Ellouz, 1993), o que levou estes autores a usarem *Phanerochaete chrysosporium*, com remoção de 65% da côr e de 73% de COD.

Nieto *et al.* (1992) observaram que, tratando águas russas com *Aspergillus terreus*, mesmo sem diluição, se obtinha uma significativa degradação dos compostos fenólicos de baixo peso molecular, com redução do teor de fenóis totais, da ordem de 30-40%. A eficácia da depuração aumentava com a diluição do efluente.

Ramos-Cormenzana *et al.* (1995) defendem que o futuro passa pela reciclagem e reutilização das águas russas como fertilizante e pela multiplicidade de usos, seja para produção de biogás, seja pela produção de biomassa para *Single Cell Protein*, já que desde 1958 está comprovado que leveduras, designadamente *Turolopsis utilis*, podem ter bom crescimento naquele efluente (Ursinos, 1958, cit. por Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995).

Ramos-Cormenzana *et al.* (ob. cit.) referem ainda a possibilidade de uso de águas russas como meio de crescimento de algas como *Dunaliella* ou *Spirullina* para produção de biomassa ou de β -caroteno, como substracto para produção microbiana de polissacáridos de interesse industrial ou farmacológico, como substracto para produção de etanol por leveduras isoladas do próprio efluente, como *Candida mickerhamii*, *Candida molischiana* e *S. cerevisiae* (Bombalov *et al.*, 1989, cit. por Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Face aos elementos de que dispomos, sem perder de vista a problemática inerente aos lagares tradicionais de pequena dimensão, procuramos seleccionar estirpes microbianas capazes de degradar águas russas em condições de aerobiose, a partir das quais ulteriormente pudessem eventualmente ser utilizados microrganismos com interesse, conforme acima referido (Ramos-Cormenzana *et al.*, ob. cit.).

Dada a adversidade das condições vigentes nesse efluente, optamos por utilizar microrganismos aeróbios, designadamente fungos filamentosos e leveduras, que em princípio estivessem a elas adaptados: estirpes isoladas das próprias águas russas.

Para isso, na campanha de 1997/98 foram recolhidas amostras de águas russas de lagares tradicionais e de linha contínua da Terra Quente Transmontana. No Laboratório de Microbiologia da ESAB procedeu-se ao rastreio e isolamento dos microrganismos presentes nos efluentes estudados. O isolamento dos fungos das amostras, em termos globais, foi efectuado em placa, utilizando os meios PDA e meio de manutenção, doravante designado de meio M, com o seguinte formulário (% p/v em relação a água desmineralizada): glucose, 2,0%; extracto de levedura, 0,5%; peptona, 1,0%; agar, 2,0%, a que se adicionou o antibiótico *Cloramphenicol*, a 0,03%, a fim de evitar contaminações bacterianas.

Seguidamente, foram efectuados testes preliminares no que respeita à resistência dos fungos isolados ao fenol, substância reconhecidamente de muito difícil biodegradabilidade e monómero-base de diversos componentes de forte pendor poluente ou tóxicos existentes nas águas russas.

Nos testes de resistência, para cada estirpe, fez-se o espalhamento em placas de Petri, com meio M a diferentes concentrações (percentagem p/v) de fenol. As placas, depois de inoculadas, foram colocadas em estufa a 30°C e foi observado o crescimento microbiano.

Posteriormente, nas estirpes que se apresentaram mais resistentes ao fenol, fomos avaliar a sua capacidade de utilização de fenol como única fonte de carbono e energia.

Para isso, transferimos uma ansada do inóculo mantido em tubo de agar inclinado para um balão de 250mL contendo 125mL de meio M líquido desprovido de glucose, ao qual foi adicionado fenol, sendo testadas as seguintes concentrações (percentagem p/v): 0%; 0,05%; 0,10% e 0,20%. Cada balão foi colocado numa incubadora orbital "Galencamp" 150 rpm e a 25-26°C.

Para avaliar o crescimento ao longo do tempo, foram retiradas amostras para medição da densidade óptica a 640nm num espectrofotómetro *Spectronic*, usando para ensaio a branco o próprio meio líquido sem fenol e sem inoculação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da análise dos resultados disponíveis, constata-se que os fungos estudados apresentaram resistências variáveis às concentrações de fenol utilizadas (Tabelas 1 a 4).

Adicionalmente, observou-se que as estirpes de fungos estudadas — duas de fungos filamentosos (MC-8/1-1 e VSS-8-1-4) e duas de leveduras (VSS-8/1-1 e C-8/1-3) — foram capazes de utilizar o fenol como única fonte de carbono e de energia (gráficos não apresentados).

Tabela 1

Crescimento da estirpe MC-8/1-1 em meio sólido com várias concentrações de fenol

Dias	Concentrações (% p/v)					
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
0 (Inoculação)	—	—	—	—	—	—
3	++	++	+	—	—	—
7	++	++	++	—	—	—
11	++	++	++	—	—	—
19	++	++	++	—	—	—

Tabela 2

Crescimento da estirpe VSS-8/1-4 em meio sólido com várias concentrações de fenol

Dias	Concentrações (% p/v)					
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
0 (Inoculação)	-	-	-	-	-	-
3	++	+	-	-	-	-
7	++	++	+	-	-	-
11	++	++	+	-	-	-
19	++	++	++	-	-	-

Tabela 3

Crescimento da estirpe VSS-8/1-1 em meio sólido com várias concentrações de fenol

Dias	Concentrações (% p/v)					
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
0 (Inoculação)	-	-	-	-	-	-
2	++	+	-	+	±	±
6	++	+	-	+	-	-
9	++	++	-	+	±	±

Tabela 4

Crescimento da estirpe C-8/1-3 em meio sólido com várias concentrações de fenol

Dias	Concentrações (% p/v)					
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
0 (Inoculação)	-	-	-	-	-	-
2	++	+	+	+	±	-
6	++	+	+	+	-	-
9	++	++	++	++	+	-

Convenções: +++ Crescimento muito expressivo ++ Crescimento expressivo + Crescimento pouco expressivo
 ± Crescimento duvidoso - Ausência de crescimento

Verificou-se que as estirpes de fungos filamentosos eram capazes de crescer a concentrações de fenol que variaram entre 0,05% e 0,1%, enquanto que para as estirpes de leveduras o crescimento foi possível para concentrações de fenol que oscilaram entre 0,05 e 0,25%.

Agradecimentos

Expressamos o nosso particular agradecimento à Sr.^a Prof.^a Doutora Leticia Fernandes, directora do Laboratório de Microbiologia da ESAB, por todo o apoio manifestado à realização deste trabalho e pelo acompanhamento e conselhos sempre oportunos, bem como pela ajuda que nos prestou.

REFERÊNCIAS

- BOMBALOV, G.; ISRAILIDIS, C.; TANCHEV, S. (1989a) — *Characterization of yeasts isolated from spontaneously fermenting fresh olive effluents*. In: *MIRCEN J. Appl. Microb. Biotechnology*, 5, pp. 259-261 (cit. Ramos-Cormenzana et al., 1995);
- BORJA, R.; MARTIN, A; ALONSO, V.; GARCIA, I; BANKS, G. (1995) — *Influence of different aerobic pretreatments on the cinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater*. In: *Wat. Res.*, Vol. 29, N.º 2, pp 489-495;
- GOUVEIA, J. (1995) — *Azeites virgens do Alto Alentejo. Comportamento químico, tecnológico e sensorial*. Dissertação de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia — UTL, Lisboa, 570 p.;
- HAMDI, M. (1991) — *Effects of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater*. In: *Bioresource Technology*, 36, pp. 173-178;
- HAMDI, M. (1992) — *Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 37, pp. 155-163;
- HAMDI, M.; GARCIA, J.; ELLOUZ, R. (1992) — *Integrated biological process for olive mill waste water treatment*. In: *Bioprocess Engineering*, 8, pp. 79-84;
- HAMDI, M.; KHADIR, A; GARCIA, J-L (1991) — *The use of Aspergillus niger for the bioconversion of olive mill waste-waters*. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, pp. 828-831;
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (1993) — *Portugal Agrícola*. Instituto de Estruturas Agrárias e de Desenvolvimento Rural, Caixa Geral de Depósitos, Lisboa, 258 p.
- MADUREIRA, M. (1992) — *Estudo das fileiras agro-alimentares mediterrânicas. O caso do azeite*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos — Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa;
- MADUREIRA, L; REBELO, J.; FERREIRA, P. (1994) — *A olivicultura e o sector do azeite em Trás-os-Montes e Alto Douro: situação actual e perspectivas*. UTAD — Departamento de Economia e Sociologia. Vila Real, 119p.;
- NIETO, L.M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; PEREJA, M.G.; HOYOS, S.E. (1992) — *Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín com Aspergillus terreus*. In: *Grasas y Aceites*, Vol. 43, Fasc. 2, pp. 75-81;
- PADILLA, R.B.; MARTIN, AM.; BARRANTES, M.M. (1992) — *Estudio cinetico del processo de biometanización de alpechín de almazara clasica previamente sometido a tratamiento aeróbico com Geotrichum candidum*. In: *Grasas y Aceites*, Vol. 43, Fasc. 2, pp. 82-86;
- RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SANCHEZ, M.; LOPEZ, M. J. (1995) — *Bioremediation of alpechin*. In: *International Biodeterioration & Biodegradation* pp. 249-268;
- ROSA, M.; VIEIRA, A (1995) — *Perspectivas e limitações no tratamento e utilização das águas residuais de lagares de azeite: situação portuguesa*. In: *Boletim de Biotecnologia*, N.º 52, pp. 8-14;
- SANTOS, L. (1998) — *A olivicultura no século XXI*. In: *Semana Agrícola "Os novos caminhos para a agricultura"*, 9-13 Março 1998, UTAD, Vila Real, pp. 51-65;

- SOARES, A (1990) — *O sector do azeite em Portugal. Caracterização e evolução*. Relatório de estágio do Curso de Eng.º Agro-Industrial, Isa, Lisboa;
- SAYADI, S. ; ELLOUZ, R. (1993) — *Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill wastewaters*. In: *J. Chem. Tech. Biotech.*, Vol. 57, pp. 141-146;
- URSINOS, F.R. (1958) — *Estudio del alpechín para su aprovechamiento industrial. Obtención de leveduras alimenticias*. In: *Grasas y Aceites*, 9, pp. 249-258 (cit. Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995);
- URSINOS, F.R.; PADILLA, R.B. (1992) — *Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain*. In: *Grasas y Aceites*, Vol. 43, Fasc. 2, pp. 101-106.