

OS FUNGOS FILAMENTOSOS, UMA OPÇÃO EM ESTUDO PARA A BIORREMEDIAÇÃO II

Lucas Tupi Caldas Pereira

Bolsista de Inic. Científica, Eng. Química, UFRJ

JudithLiliana Solórzano Lemos

Orientadora, Eng^a. Química, D. Sc.

RESUMO

Apontado por pesquisas anteriores, Aspergillus versicolor tem mostrado um potencial significativo na eficiência de biodegradação de solo contaminado com petróleo.

Portanto, o presente trabalho visa otimizar a idade e tamanho de inóculo, bem como determinar a fonte de nitrogênio que beneficia a degradação do contaminante.

Os experimentos realizados com o fungo filamentoso, utilizando tempos de cultivo de 4–7 dias, em concentração igual a 10^7 conídeos/g de solo, apontaram o inóculo de 5 dias como o mais recomendável para o presente trabalho.

A seguir, foram preparados ensaios com inóculos em várias concentrações, cujos resultados mostraram que o inóculo de $4,0 \times 10^7$ conídeos/g de solo era de 14 a 17 % mais eficiente quanto à biodegradação do que aqueles com maiores ou menores concentrações.

A fim de determinar a melhor fonte de nitrogênio, realizaram-se experimentos empregando tanto fontes orgânicas como inorgânicas, com relações Carbono/ Nitrogênio (C/N) iguais a 100/10, obtendo a melhor eficiência de biodegradação (39,5%) ao empregar extrato de levedura.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características dos fungos

Os fungos estão restritos a uma existência saprofítica ou parasita, sendo abundantes no solo, nos vegetais e em massas de água, onde vivem muito bem em folhas mortas ou em madeira. São responsáveis pela decomposições de substâncias orgânicas, causam a maior parte das enfermidades das plantas e dos animais, no entanto, são utilizados em larga escala nos processos industriais de fermentação, na produção de ácidos orgânicos e de algumas preparações vitamínicas, na obtenção de certas drogas antibióticas e são ainda empregados em processos de biorremediações (<http://www.consulteme.com.br/biologia/fungof2.htm>).

O principal elemento da forma vegetativa ou de crescimento de um bolor é a hifa (do grego *hyphē* = teia), uma estrutura tubular ramificada com cerca de 2 a 10 μ de diâmetro, que cresce pelo alongamento de suas pontas (crescimento apical) e pela produção de ramificações laterais, que quando em abundância recebe o nome de micélio (do grego *mykes* = cogumelo). Essa estrutura é dividida em micélio vegetativo, cujas hifas penetram no meio onde absorvem nutrientes; e micélio aéreo ou reprodutivo, cujas hifas se projetam acima da superfície, dando suporte às células reprodutivas ou esporos (<http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/fungos.pdf>).

Os fungos reproduzem-se por meio de ciclos sexuais e assexuais. Sendo conhecidos três mecanismos desse último: esporulação, seguida de germinação dos esporos; brotamento e fragmentação da hifas, sendo os esporos a forma mais comum de reprodução assexuada.

Os conídeos são esporos assexuados que se formam nas extremidades das hifas reprodutivas, os quais germinam quando encontram o meio apropriado. Os esporos variam bastante em cor, tamanho e forma. Sua morfologia e modo de origem constituem a principal base para a classificação dos fungos que não possuem sexualidade.

1.2. Fonte de nitrogênio

O conhecimento nutricional dos fungos é de grande importância, pois permite o crescimento e desenvolvimento de um fungo em laboratório.

Os fungos possuem duas classes de nutrientes: os macronutrientes, exigidos em concentrações por volta de 10^{-3} M, à qual pertence o nitrogênio, e os micronutrientes, requeridos em concentrações em torno de 10^{-6} M ou menos.

O nitrogênio se apresenta de várias formas como fonte nutricional. Entretanto, é encontrado no solo em grandes quantidades na forma de nitrato. Das demais formas encontradas no solo, somente a amônia, apesar de ser tóxica, é contornável pela microbiota, pois é encontrada na forma de seu íon NH_4^+ (PUTZKE J. & PUTZKE T. L. , 2002).

A assimilação de nitrato ou de nitrito pelos microrganismos conduz à redução de ambas fontes de N a amônia, através de vias metabólicas específicas. A redução de nitrato a amônia envolve duas enzimas: nitrato redutase e nitrito redutase (WIEME *et al.*, 1985; GRIFFIN, 1994).

Os microorganismos mostram grande diversidade na utilização de fontes de nitrogênio. Alguns são autotróficos em relação a este nutriente, sendo capazes de crescer em nitrato, amônia, e algumas vezes em nitrogênio gasoso; outros, necessitam de aminoácidos, purinas e pirimidinas (RHODES & FLETCHER, 1966).

2. OBJETIVO

O presente trabalho visa a otimização da degradação de hidrocarbonetos de petróleo (HP), através do estudo da influência das condições fisiológicas de *A. versicolor*, bem como do tamanho de inóculo e da fonte de nitrogênio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Determinação do melhor dia de cultivo

A. versicolor foi cultivado em tubos inclinados contendo meio Czapeck agarizado, a fim de obter conídeos com idades de 4, 5, 6 e 7 dias, os quais foram usados como inóculos em concentrações iguais a 10^7 esporos/g de solo. Os meios para biodegradação eram constituídos de 50g de solo, contidos em kitassatos de 250 mL, em duplicata, com teor de umidade corrigido para 100% da capacidade de retenção de água (CRA) e sem adição

de nutrientes. O experimento foi conduzido à 40°C, durante 18 dias, sob monitoramento semanal da CRA.

3.2 Tamanho de inóculo

O inóculo empregado no presente experimento foi obtido através da propagação de biomassa em garrafas de Roux, contendo Czapeck agarizado. Os conídeos, obtidos após 5 dias de cultivo foram removidos através da adição de 15 mL de água destilada estéril e fricção da superfície agarizada com bastão de vidro, de aproximadamente 4 cm de comprimento. Após esse procedimento para obtenção de uma suspensão de conídeos, os mesmos foram contados em câmara de Neubaur, e a seguir inoculados em concentrações de 1×10^7 ; $2,5 \times 10^7$; $4,0 \times 10^7$ e $5,5 \times 10^7$ conídeos/g de solo. Os ensaios foram preparados em duplicata, em kitassatos de 250 mL, contendo cada um 50 g de solo e teor de umidade ajustado em 100% da CRA, monitorada semanalmente. Os frascos foram acondicionados em estufa a 40°C, durante 21 dias de experimento.

3.3 Fonte de nitrogênio

Microorganismo

A. versicolor foi cultivado como especificado no item 3.2 para obtenção do inóculo, sendo semeado em concentração de $2,5 \times 10^7$ conídeos/g de solo.

Procedimento

Para a realização deste experimento foram empregadas fontes orgânicas [uréia ((NH₂)₂CO) e Extrato de Levedura (EL)] e inorgânicas [sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e nitrato de sódio(NaNO₃)] de nitrogênio, com o propósito de avaliar o efeito desse macronutriente na degradação de petróleo, conjuntamente com o nitrogênio já presente no solo (1mg/g de solo). O solo em estudo possuía uma relação C/N de 100/4,55. No entanto, os experimentos foram conduzidos, ajustando as relações C/N em 100/10, sabendo que o teor de C do solo era igual a 22,32 mg/g solo. A composição dos meios em fontes de nitrogênio, estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição em nitrogênio dos meios de biodegradação, empregando Uréia, EL, Sulfato de amônio e nitrato de sódio na relação C/ N = 100/10

Fonte de nitrogênio	g/ 50 g de solo seco*
EL	0,57
Uréia	0,13
NaNO ₃	0,36
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,28

*Descontado o nitrogênio natural existente.

Os ensaios foram preparados em duplicata, em kitassatos de 250 mL, contendo cada um 50 g de solo e teor de umidade ajustado em 100% da CRA, monitorada semanalmente. Os frascos foram acondicionados em estufa a 40°C, durante 30 dias de experimento .

3.4 Quantificação de CO₂

O monitoramento da biodegradação foi realizado por cromatografia gasosa mediante a dosagem de CO₂, produto do metabolismo celular. Preparou-se uma atmosfera contendo as amostras de solo inoculadas, na qual foi recolhido em volume de 500µL para injeção no cromatógrafo do tipo HP 5890 série II, cujas condições de análise descritas a seguir:

Vazão do gás de arraste (He) → 17.89 mL/min

Vazão do gás de referência (He) → 17.89 mL/min

Temperatura do detector: 220°C

Temperatura do forno auxiliar: 74°C

Temperatura do injetor: 110°C

Coluna de aço inox (3m/3mm) recheada com Chromosorb 102

Com os resultados obtidos na cromatografia e na estimativa de incorporação do contaminante à biomassa (50%), calculou-se a eficiência de biodegradação (EB) da seguinte forma:

Massa de Carbono = 2 x Massa de carbono proveniente de CO₂ gerado
Biodegradada Totalmente

$$EB\% = \frac{\text{Massa de carbono biodegradada totalmente}}{\text{Massa de carbono orgânico total do solo}} \times 100$$

3.4 Determinação de pH

Para os ensaios de pH foram usados 20g de cada amostra de solo, aos quais foram adicionados 50 mL de água deionizada. As amostras, acondicionadas em frascos de 250 mL foram agitadas em "shaker" a 150 rpm, durante 1 hora. Sendo as leituras dos valores de pH feitas após 30 min de decantação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Idade do inóculo

Com a finalidade de otimizar a idade mais adequada do inóculo foi preparado um experimento empregando conídeos com diferentes dias de cultivo (4 a 7 dias), cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Verificamos que o estado fisiológico da biomassa não propiciou diferença significativa entre os percentuais de EB correspondentes. E embora o dado referente ao 6º dia tenha mostrado um resultado ligeiramente inferior aos demais, acredita-se tenha ocorrido um erro experimental, visto que o resultado referente ao 7º dia encontra-se próximo aos do 4º e 5º dias.

Tabela 2 - Otimização das condições de cultivo de *A. versicolor* considerando o tempo de cultivo dos mesmos antes de ser empregados como inóculo no processo de biodegradação de óleo cru

Tempo (dias)	EB (%) 4 dias	EB (%) 5 dias	EB (%) 6 dias	EB (%) 7 dias
1	0,12	0,10	0,05	0,05
2	0,45	0,42	0,50	0,38
3	0,82	0,80	0,87	0,74
7	1,96	2,12	2,01	1,95
10	2,77	3,07	2,65	2,74
12	3,07	3,33	2,86	2,99
14	3,66	3,82	3,37	3,59
16	4,08	4,25	3,62	3,89
18	4,44	4,55	3,88	4,34

A partir das observações realizadas optou-se por empregar inóculos com 5 dias de cultivo por razões econômicas, tendo em vista que, inóculos mais velhos só implicariam em maiores gastos de energia por permanecer mais tempo na estufa, e inóculos mais novos requeririam um consumo maior de meio, uma vez que é necessário maior quantidade de biomassa para obter o mesmo tamanho de inóculo.

4.2 Tamanho de inóculo

A consistência dos resultados experimentais depende, em grande parte, do emprego de conídeos nas mesmas condições fisiológicas e de que sejam adicionados ao meio nas mesmas concentrações (GRIFFIN, 1994). Considerando a importância da padronização do inóculo foi preparado um experimento empregando conídeos em diferentes concentrações, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Otimização de meio de cultura para *A. versicolor* utilizando diferentes concentrações de conídeos

Tempo (dias)	EB (%) 1 x 10 ⁷ coní / g solo	EB (%) 2,5 x 10 ⁷ coní / g solo	EB (%) 4,0 x 10 ⁷ coní / g solo	EB (%) 5,5 x 10 ⁷ coní / g solo
0	0	0	0	0
1	0,65	1,14	1,17	0,71
2	1,06	1,67	1,93	1,32
3	1,54	2,26	2,62	1,96
4	2,08	2,95	3,24	2,52
7	3,55	4,30	4,58	3,13
9	4,22	4,90	5,29	4,01
14	5,60	6,15	6,81	5,71
16	6,35	6,78	7,63	6,32
18	6,99	7,32	8,33	7,19
21	7,84	8,09	9,20	7,90

Sabe-se que através dos dados experimentais mostrados na tabela acima podemos observar que a eficiência de biodegradação para inóculos com 4,0x 10⁷ conídeos/ g de solo foi 14-17 % maior quando comparada às outras

amostras. Sendo que, por razões econômicas, inóculos com concentrações inferiores tornam-se mais atraentes.

4.3. Fonte de nitrogênio

Foram preparadas amostras contendo fontes de nitrogênio orgânicas (EL e $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) e inorgânicas ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3) e uma amostra controle, a fim de avaliar o efeito das fontes de nitrogênio no metabolismo de *Aspergillus versicolor*, através das respectivas eficiências de biodegradação. Após 30 dias de monitoramento, obteve-se a maior eficiência de biodegradação fazendo uso de Extrato de Levedura (39,5 %) como fonte de nitrogênio, enquanto que com as demais (Uréia, Sulfato de Amônio e Nitrato de Sódio) os resultados foram decrescentes em relação à fonte anterior. Sendo as respectivas EB da ordem de 17,41%, 6,8 % e 4,8 %, como mostra a Figura 1. Observa-se ainda na Figura 1 que os resultados obtidos com as fontes inorgânicas foram inferiores ao da amostra controle (9 %). Isso sugere que, em relação ao nitrato, o fungo não deve possuir as enzimas responsáveis para a redução de nitrato a amônia: nitrato redutase e nitrito reductase (WIAME *et al.*, 1985; GRIFFIN, 1994), responsáveis pela assimilação dessa fonte inorgânica de nitrogênio. Quanto ao sulfato de amônio, o fungo, provavelmente, também carece do sistema de transporte do íon amônio que é carregado pelo mesmo sob forma de amônia, ocasionando a liberação do íon H^+ , que acidifica, conseqüentemente, o meio de fermentação. Nota-se nos dados da Tabela 4 que, os valores de pH finais das amostras contendo as diferentes fontes de nitrogênio foram próximos entre se, com um valor ligeiramente inferior (pH = 4, 7) para a amostra contendo sulfato de amônio, em relação ao Controle, o que pode indicar um uso, aparentemente, moderado dessa fonte.

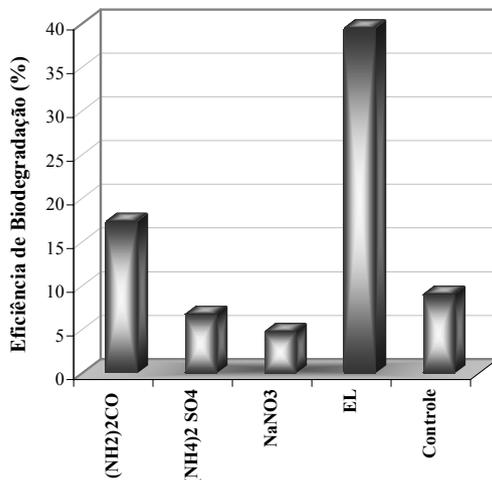


Figura 1. Comparação da EB(%) alcançada por *A. versicolor*, utilizando (NH₂)₂CO, (NH₄)₂SO₄ e NaNO₃ e EL após 30 dias de experimento.

Tabela 4. Valores de pH, inicial e final das amostras contendo as fontes de nitrogênio

Fontes de Nitrogênio	pH inicial	pH final
Uréia	4,67	5,9
Sulfato de Amônio		4,7
Nitrato de Sódio		5,9
Extrato de Lêvedo		5,9
Controle		5,3

Durante o cultivo de *A. versicolor* observou-se uma ligeira elevação dos valores de pH (Tabela 4) nos meios elaborados a base de uréia, quando comparados com os do controle. Ocorre que, na presença de urease, amônia é liberada no meio de fermentação como resultado da hidrólise enzimática de uréia, incrementando os valores de pH (SCHLEGEL, 1989). Entretanto, não parece ter havido um emprego considerável dessa fonte de nitrogênio, visto o resultado em EB.

O confronto dos dados extraídos do presente experimento deixam patente a preferência de *A. versicolor* por EL. Sabe-se que o EL estimula o crescimento de diversos microrganismos, visto que esse substrato é uma fonte de aminoácidos e de vitaminas, especialmente do complexo B, fazendo com que os referidos microrganismos apresentem crescimento acelerado (RHODES & FLETCHER, 1966) e possam ser beneficiados, de um modo geral, nos seus processos biológicos. Isso pode ser corroborado na Figura 2 que mostra a cinética de degradação de HP empregando as diferentes fontes de N, utilizadas no presente experimento. Na mesma figura podemos também observar que, existe uma tendência ainda crescente de degradação nas curva de EL e uréia, diferentemente do que mostram as demais após 30 dias de avaliação.

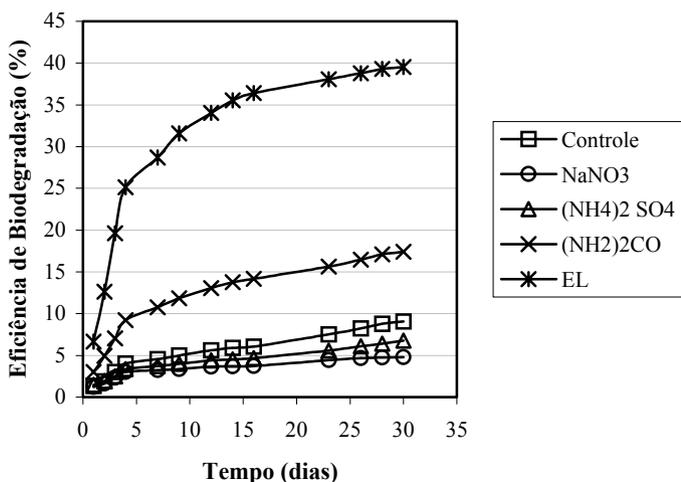


Figura 2. Cinética da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por *A. versicolor* empregando EL, (NH₂)₂CO, (NH₄)₂SO₄ e NaNO₃, na relação C/N de 100/10.

Portanto, percebe-se que a utilização de determinado composto na nutrição microbiana não é uma tarefa simples, pois depende de dois fatores: da habilidade genética do microrganismo para sintetizar a enzima requerida para sua captação e da sua capacidade em responder ao fenômeno de indução.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir que inóculos com 5 dias de cultivo e concentração de $4,0 \times 10^7$ conídeos/g de solo, são os mais recomendáveis para a obtenção da melhor eficiência de biodegradação. Do mesmo modo que, EL consitui-se na melhor fonte de nitrogênio dentre todas as estudadas.

BIBLIOGRAFIA

- Características dos fungos. Disponível em: <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/fungos.pdf>. Acesso em: 11 de junho de 2002
- Fungos. Disponível em: <http://www.consulteme.com.br/biologia/fungof2.htm> Acesso em: 07 de novembro de 2002
- GRIFFIN, D.H. (1994). FUNGAL PHYSIOLOGY, 2ª EDIÇÃO. JOHN WILEY & SONS, INC. PUBLICATIONS, NEW YORK.
- Putzke J. e Putzke T. L., (2002). "Os reinos dos fungos", vol. 2, editora UNISC, Santa Cruz do Sul.
- Rhodes, A. & Fletcher, D.L. (1966). Principles of industrial microbiology. Pergamon Press, Oxford.
- Schlegel, H.G. (1989). The Metabolism of Microorganisms. Em: Basic Biotechnology – A Student's Guide, P Präve, U Faust, W Sittig and DA Sukatsch, eds pp 67-101, New York.