

# OS FUNGOS FILAMENTOSOS, UMA OPÇÃO EM ESTUDO PARA A BIORREMEDIAÇÃO I

Leonardo Tupi Caldas Pereira

Bolsista de Inic. Científica, Eng<sup>a</sup>. Química, UFRJ

Judith Liliana Solorzano Lemos

Orientadora, Eng<sup>a</sup>. Química, D. Sc.

## RESUMO

*O presente trabalho, teve por objetivo dar continuidade a um estudo (PEREIRA e LEMOS, 2003) onde foram abordados aspectos relacionados com a otimização das condições de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus versicolor*, selecionado anteriormente (PEREIRA et al., 2002) como o fungo com maior potencial de biodegradação. Os fatores otimizados foram a temperatura e a capacidade de retenção de água (CRA), uma vez que não foi possível*

*definir claramente os níveis apropriados para o processo no trabalho anterior. Para isso foi realizado um planejamento fatorial 3<sup>2</sup>, com a finalidade de obter informações sobre a influência de variáveis de entrada (Temperatura e CRA) sobre a variável dependente (eficiência de biodegradação (EB)). Os dados experimentais mostraram que dentre as condições estudadas o melhor resultado de biodegradação foi alcançado ao empregar 100% da CRA e 40°C.*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PARÂMETROS QUE AFETAM O PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO

Os fungos filamentosos pela sua peculiar capacidade de crescer em ambientes com baixa umidade relativa e na ausência de água livre, são por estas razões, os que melhor se adaptam a este tipo de fermentação. Assim, os microrganismos de importância industrial empregados em fermentação em meio semi-sólido (FMSS) crescem todos, na natureza, sobre substratos com reduzida umidade e pertencem geralmente a espécies de um dos seguintes

gêneros: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (PANDEY *et al.*, 2000).

Para desenvolver processos biológicos em meio semi-sólido (MSS) é necessário que uma série de condições sejam controladas, dentro de limites admissíveis com as características do processo. Sabe-se que a manutenção de condições homogêneas no MSS é uma tarefa árdua de ser conseguida, tornando a coleta de amostras representativas extremamente difícil, pela própria dificuldade em manter condições homogêneas em toda a massa semi-sólida. Os principais parâmetros que afetam o desenvolvimento e produção do microrganismo em MSS são: umidade, temperatura e pH (PANDEY *et al.*, 1999).

### **1.1.1. UMIDADE**

Como o suprimento de umidade é sempre um fator limitante em MSS, o seu controle dentro de uma faixa constante e relativamente estreita é essencial para a otimização do processo biológico, pois a disponibilidade de oxigênio é inversamente proporcional ao grau de umidade da massa tratada (LONSANE *et al.*, 1992).

Com um meio sólido adequadamente umedecido, forma-se sobre o mesmo uma fina película de água, deixando, porém, livre os interstícios entre as partículas sólidas. Permitindo, de um lado, um adequado intercâmbio de nutrientes e de oxigênio, e do outro uma adequada circulação de ar para a dissipação do calor. O teor de umidade do substrato pode, em alguns casos influenciar também, e de modo extremamente drástico, o metabolismo do microrganismo pelo efeito que exerce sobre a transferência de O<sub>2</sub> (THIEMANN, 1985).

### **1.1.2. TEMPERATURA**

A temperatura exerce uma função primordial tanto sobre o crescimento, germinação e esporulação dos fungos, como também sobre o seu metabolismo. O controle da temperatura é fundamental quando se trata de MSS, pois o acúmulo excessivo de calor pode ocasionar uma paralização da produção metabólica.

O controle da temperatura de uma fermentação, processo bastante simples em fermentação submersa (FS), torna-se bastante problemático quando se trata de FMSS, ao ponto de ser um dos problemas mais graves no escalonamento das fermentações (MITCHELL *et al.*, 2000).

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo otimizar os níveis de temperatura e de capacidade de retenção de água (CRA) apropriados para a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (HP) contidos no solo de Guararema, 3ª remessa, usando *Aspergillus versicolor* como agente de degradação.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. AMOSTRAS DE SOLO**

As amostras de solo utilizados no desenvolvimento dos testes foram as coletadas em outubro de 2001 e por isso pertencentes à 3ª remessa.

### **3.2. MICRORGANISMO**

Os ensaios de biodegradação foram realizados utilizando-se *A. versicolor*, como agente de degradação. Para obtenção do inóculo foram utilizados tubos inclinados contendo meio sólido (Czapeck agarizado). As condições de cultivo foram: 30°C, durante 6-7 dias. Em seguida, os conídeos foram suspensos em água destilada estéril, contados em câmara de Neubauer e inoculados na concentração de  $10^7$  conídeos/g de solo.

### **3.3. CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO**

Os ensaios de degradação do solo contaminado foram realizados em kitassatos de 250 mL, contendo cada um 50g de amostra. As dosagens de CO<sub>2</sub> foram feitas em dias alternados, sendo as amostras aeradas com ar comprimido, por 2 minutos, após a determinação do referido gás. O experimento foi feito a diferentes temperaturas e teores de umidades, especificados na Tabela 1.

**Tabela 1 . Fatores de controle e níveis empregados no planejamento 3<sup>2</sup>**

Fatores	Níveis		
	Nível (-1)	Ponto central (0)	Nível (+1)
T (°C)	20	30	40
CRA (%)	50	75	100

### **3.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL**

O planejamento experimental foi utilizado como uma ferramenta para avaliar a influência de fatores considerados importantes no processo de biorremediação, bem como no metabolismo dos microrganismos.

O experimento foi realizado com quatro réplicas apenas para o ponto central, com o objetivo de estimar o erro experimental e avaliar a significância estatística dos efeitos.

Para tal experimento foi realizado um planejamento fatorial 3<sup>2</sup>, cujas combinações entre fatores e níveis está apresentada na matriz de planejamento que se encontra na Tabela 2.

**Tabela 2 . Matriz do planejamento experimental 3<sup>2</sup>**

Ensaio	T	CRA
1	+1	+1
2	+1	0
3	+1	-1
4	0	+1
5	0	0
5	0	0
5	0	0
5	0	0
6	0	-1
7	-1	+1
8	-1	0
9	-1	-1

### 3.5. QUANTIFICAÇÃO DE CO<sub>2</sub> GERADO

O acompanhamento dos ensaios realizados foram feitos mediante a dosagem de CO<sub>2</sub> por cromatografia gasosa. O CO<sub>2</sub> gerado é produto do metabolismo celular dos fungos e da própria microbiota nativa. O gás, foi confinado em kitassato de 250 mL, vedado com rolha de borracha na abertura superior, e com uma mangueira de latex na saída lateral, comprimida com uma pinça de Hofman. O CO<sub>2</sub> foi colhido da atmosfera interna do frasco ("headspace") de 250 mL com auxílio de uma seringa de 500µL, contendo as amostras de solo contaminado. O aparelho empregado nesta determinação foi o cromatógrafo HP5890 série II, cujas condições de análise encontram-se 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 base no valor acumulado de CO<sub>2</sub>, calculado no final dos experimentos e na estimativa de incorporação do contaminante á biomassa (50%), calculou-se a eficiência de biodegradação (EB) da seguinte forma:

Massa de Carbono = 2 x Massa de carbono proveniente de CO<sub>2</sub> gerado  
Biodegradada Totalmente

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

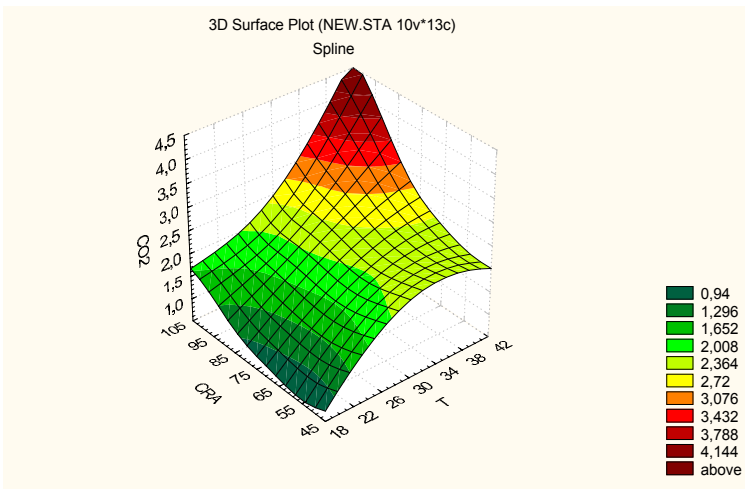
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à variável de resposta para otimização da Temperatura e Capacidade de Retenção de Água, baseado no planejamento fatorial 3<sup>2</sup>, são mostrados na Tabela 3. Observa-se que o CO<sub>2</sub> acumulado nas amostras variou de 0,91 a 4,09 mmol, gerados ao longo de 21 dias de tratamento. Na mesma tabela podem ser encontradas as respectivas EB com valores entre 1,96% e 8,80%, respectivamente.

Tabela 3 . Resultados obtidos no planejamento experimental fatorial 3<sup>2</sup>

Ensaio	Fatores		CO <sub>2</sub> (mmol)	EB (%)
	T	CRA		
1	+1	+1	4.09	8.80
2	+1	0	2.47	5.31
3	+1	-1	2.10	4.50
4	0	+1	2.14	4.61
5	0	0	1.02	2.20
5	0	0	1.92	4.03
5	0	0	2.19	4.72
5	0	0	0.93	2.00
6	0	-1	2.21	4.75
7	-1	+1	1.69	3.63
8	-1	0	1.04	2.24
9	-1	-1	0.91	1.96

Na Figura 1 podemos constatar o resultado da influência da temperatura e da CRA na variável de resposta (CO<sub>2</sub>) para o planejamento fatorial 3<sup>2</sup>. Analisando o mesmo gráfico, pode-se constatar a importância da CRA no incremento de CO<sub>2</sub>, principalmente quando empregados 100% desse fator. Logo, o monitoramento da umidade das amostras de solo e a sua constante reposição contribuíram para a obtenção de respostas mais adequadas no que se refere ao fator CRA. Paralelamente, foi possível observar que a temperatura foi também importante na obtenção de resultados mais expressivos na eficiência de biodegradação, tornando-se esse fato mais evidente com o emprego de 40°C. No entanto, a utilização de temperaturas superiores a essa acarretam efeitos desfavoráveis no processo de biodegradação, como foi evidenciado em um trabalho anterior (PEREIRA e LEMOS, 2003).



**Figura 1 - Influência da Temperatura e da CRA na variável de resposta (CO<sub>2</sub>) para o planejamento 3<sup>2</sup>.**

O experimento foi realizado com quatro repetições apenas para o ponto central, cujo resultado em CO<sub>2</sub> mostra uma variação considerável (0.93 a 2.19 mmol). Por outro lado, podemos verificar na Tabela 4 que o resultado do desvio padrão (0,63) é também superior ao recomendado para experimentos desta natureza. Sendo que, as diferenças entre as réplicas pode ter sido decorrente da montagem do sistema utilizado para a realização dos experimentos. Pois, o emprego de mangueiras de látex, vedadas numa das extremidades com pinças de Hofman, representam um ponto de fuga do CO<sub>2</sub> liberado, tornando-se as vezes a maior causa de erro experimental. Da mesma forma que, se a borracha de vedação da saída superior do kitassato, não for devidamente apertada, pode-se constituir em outro ponto de perda do CO<sub>2</sub> gerado pelo metabolismo microbiano.

A partir dessas observações foi preparado um novo experimento com o intuito de avaliar as causas dos erros experimentais acima citados, bem como para confirmar o considerável incremento em CO<sub>2</sub> (Tabela 3) quando empregada temperatura de 40 ° (4,09 mmol) em comparação com a de 30° (2,14 mmol), trabalhando com amostras de solo, em triplicata, e CRA igual a 100% para ambas condições.

**Tabela 4 . Análise de estatística descritiva**

<b>Características da amostra</b>	<b>Valores</b>
Média	1.51
Erro padrão	0.31
Mediana	1.47
Desvio padrão	0.63
Variância da amostra	0.40
Mínimo	0.93
Máximo	2.19
Soma	6.06
Contagem	4.00
Nível de confiança (95.0%)	1.00

Observando os dados apresentados na Tabela 5, verificamos que o valor do desvio padrão (0,38), no presente experimento, aproximou-se da metade do obtido no planejamento fatorial  $3^2$  (0,63). Provavelmente, porque os erros decorrentes da fuga de CO<sub>2</sub> foram minimizados. Podendo também confirmar esse fato, através dos valores máximo (2,51) e mínimo (2,11) das amostras avaliadas.

**Tabela 5 . Análise de estatística descritiva**

<b>Característica da amostra</b>	<b>Valor</b>
Desvio padrão	0,38
Mínimo	2,11
Máximo	2,51

Através dos dados experimentais, mostrados na Figura 2, podemos corroborar que com o aumento da temperatura em 10°C, foram alcançados valores 62% maiores quando utilizados 40° (EB= 7,84%) no processo de biodegradação. Ou seja, a influência da temperatura no processo metabólico é de extrema importância em condição de CRA igual a 100%, empregando *A. versicolor* como agente degradador.



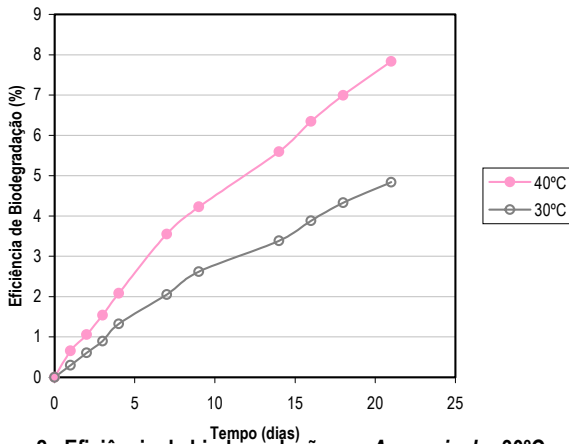


Figura 2 - Eficiência de biodegradação por *A. versicolor* 30°C e 40°C.

## 5. CONCLUSÕES

Com o presente estudo podemos concluir que a variável de resposta atingiu resultados mais expressivos quando utilizamos 100% da capacidade de retenção de água e temperatura igual a 40°C. Conclui-se que o emprego de 40°C, se comparado com 30°C, possibilita um aumento de 62% nos resultados da EB, quando utilizados conídeos como forma de inoculação.

## BIBLIOGRAFIA

- Brown, D.E. (1988). The submerged culture of filamentous fungi. Em: Physiology of industrial fungi. Editado por D.R. Berry, Blackwell, scientific publication, London, pg. 219-248.
- Lonsano, B.K., Saucedo-Castaneda, G., Rimbault, M., Roussos, S., Viniestra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. & Krishnaiah, M.M. (1992). Scale-up strategies for solid state fermentation systems. Process. Biochem. Volume 27. Pg. 256-273.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M. & Pandey, A. (2000). New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. Process Biochem. Volume 35. Pg. 1211-1225.

- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*. Volume 77. Pg. 149-162.
- Pandey, A., Soccol, C.R. & Mitchell, D. (2000). New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem*. Volume 35. Pg. 1153-1169.
- Thielmann, J.E., (1985). Em: Anais do II Seminário de "Hidrólise Enzimática de Biomassas". Editores, Flávio Faria de Moraes e Gisella Maria Zanin. Maringá, Volume 1. Pg. 107-131.
- Pereira, L.T.C., Santos, L.C., Raimundo, R.S., Araujo, F.S.M., Lemos, J.L.S. Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos. In: 2° CONIC - SEMESP - 2002 - 2° Congresso Nacional de Iniciação Científica, 2002, São Carlos(SP). v.2. p.968.
- Pereira, L.T.C., Lemos, J.L.S. Otimização das condições de cultivo para fungo filamentoso envolvido na biorremediação de solos impactados por óleo cru. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas. 2003. p.AB-009.