

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO

Flávia S. M. de Araújo

Bolsista de Inic. Científica, Bacharel em Química, UFF

Judith Liliana Solórzano Lemos

Orientadora, Eng^a Química, D. Sc.

RESUMO

O presente estudo diz respeito ao isolamento e identificação de fungos filamentosos extraídos de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Através do isolamento, feito a partir de solo de Guararema (primeira remessa), foram obtidas 75 colônias, dentre as quais apenas 60, que apresentaram capacidade de degradação de hidrocarbonetos em meio sintético, foram selecionadas para

*identificação. O resultado da identificação conduziu ao agrupamento das linhagens em 4 gêneros, subdivididos nas seguintes espécies: *Aspergillus niveus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium corylophilum*, *Parcilomyces variotti*, *Paecilomyces niveus* e *Fusarium sp.**

1. INTRODUÇÃO

A biorremediação, definida como a transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-los inofensivos, pode envolver o emprego de microrganismos inerentes ao produto contaminante e ao meio ambiente, ou ainda pode lançar mão de microrganismos exógenos (BENNETT & FAISON, 1997). De um modo geral, a biorremediação requer um mecanismo para estimular e manter a atividade microbiana. Normalmente, este mecanismo é um sistema de entrega que provê um ou mais dos seguintes componentes: um acceptor de elétrons (oxigênio, nitrato); nutrientes (nitrogênio, fósforo); e uma fonte de energia (carbono).

Os principais microrganismos degradadores de hidrocarbonetos são as bactérias e fungos. Os fungos filamentosos possuem algumas características que determinam porque esses microrganismos são considerados bons degradadores. Devido ao seu crescimento micelial, os fungos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares; disponibilizando, desta forma, o acesso para o ataque bacteriano. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse: meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microrganismos (DAVIS & WESTLAKE, 1979; BOUCHEZ et al., 1996).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar os fungos filamentosos com capacidade degradadora de hidrocarbonetos de petróleo presentes nos solos contaminados de Guararema.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento de Microrganismos

O isolamento microbiano foi feito a partir de duas amostras de solo de Guararema contaminado (primeira remessa) com uma delas apresentando emboloramento visível. Para isso, pesaram-se 10 g de cada uma das amostras, sendo adicionados a frascos cônicos de 250 mL, contendo cada um 90 mL de solução salina 0,85%. Transcorridos 5 dias, as suspensões foram agitadas por 1h a aproximadamente 150 rpm, em temperatura ambiente. A seguir prepararam-se diluições 10^{-2} e 10^{-3} , a partir da suspensão original (10^{-1}) e realizou-se o plaqueamento transferindo 0,2 mL de cada uma das suspensões para placas de Petri, sendo estas incubadas em estufa a 30°C até o aparecimento de colônias características.

Foram utilizados 3 meios distintos: Sabouraud, Batata Dextrose Agar (BDA) e Czapeck com intuito de oferecer opções nutricionais apropriadas para o desenvolvimento dos diversos fungos presentes nas amostras. Na tabela 1 mostra-se a composição química dos meios. O pH dos mesmos foi ajustado em 5, utilizando-se ácido tartárico 10% esterelizado a frio.

Tabela 1 - Composição dos meios Sabouraud, BDA e Czapeck

Sabouraud (g/L)		BDA (g/L)		Czapeck (g/L)	
Peptona	10,0	Infusão de batata	4,0	NaNO ₃	3,0
Glucose	40,0	Glicose	20,0	Sacarose	30,0
Agar-agar	15,0	Agar-agar	15,0	MgSO ₄	0,5
				KCl	0,5
				FeSO ₄	0,01
				K ₂ HPO ₄	1,0
				Agar-agar	13,0

Para minimizar o aparecimento de bactérias, foi também realizado o plaqueamento microbiano em meios semelhantes aos anteriores, cujos valores de pH foram ajustados em 4. Escolheram-se para o isolamento propriamente dito, as placas que permitiram o crescimento afastado das colônias, transferindo as mesmas para tubos de ensaio contendo os respectivos meios agarizados. Linhagens inoculadas nos tubos de ensaio que apresentaram uma possível contaminação, foram isoladas novamente utilizando-se a técnica do esgotamento.

3.1.1 Técnica do Esgotamento

Removeram-se as colônias de fungos, crescidas anteriormente em tubos inclinados, sendo a semeadura feita por estrias em uma sequência de três etapas. Na primeira etapa colocou-se a colônia de fungo na superfície e deslizou-se a alça de platina em zig-zag cobrindo 1/3 da placa com o cuidado de não tocar o meio já semeado. Na segunda etapa e na terceira, o processo foi repetido cobrindo-se os dois restantes 1/3 da placa. As placas foram incubadas a 30°C com o aparecimento das colônias em 2-3 dias. Os meios usados foram os mesmos dos experimentos anteriores, estando os valores de pH ajustados em 5,6 para Sabouraud e BDA e 7,0 para Czapeck. As colônias isoladas e aparentemente puras foram transferidas para tubos de

ensaio contendo meios idênticos aos empregados no esgotamento. Esses tubos foram reservados para os testes de degradação e futuras identificações.

3.2 Determinação da Capacidade de Degradação de Hidrocarbonetos

A determinação qualitativa da capacidade de degradação de hidrocarbonetos, das linhagens já isoladas, foi conduzida em placas para cultura de células em poliestireno com 24 cavidades, em cada uma das quais foram adicionados 1,8 mL de meio mineral líquido, 10 µL de óleo cru e inóculo fúngico equivalente a uma alçada abundante, obtida através da remoção delicada de conídeos e micélio de cada microrganismo isolado. A composição do meio mineral está especificada na Tabela 2.

Tabela 2 - Meio mineral usado nas placas para cultura de células em poliestireno

Componente	Concentração (g/L)
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
KNO ₃	3,0

3.3 Identificação

As linhagens isoladas foram identificadas nas dependências da FIOCRUZ, no setor de Micologia de acordo com a metodologia descrita por GERLACH e NIRENBERG (1982), utilizando meio nutritivo sintético agarizado-SNA (NIRENBERG, 1989) e BDA, aplicando a técnica do microcultivo segundo RIVALIER e SEYDEL (1932). Os fungos filamentosos foram identificados de acordo com ARX (1981), PITT (1985), RAPPER e FENNELL (1965) e SUTTON (1980).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de Microrganismos

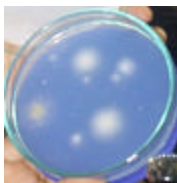
Vários microrganismos foram obtidos no presente trabalho através de meios e técnicas convencionais de isolamento. Sabendo-se que os fungos filamentosos possuem uma resistência maior do que bactérias e leveduras quando expostos a valores de pH extremos, pudemos observar que as colônias de fungos filamentosos tiveram um maior crescimento na superfície de meios cujos valores de pH foram ajustados em 4 (figura 1), quando comparado ao crescimento obtido nos meios ajustados em pH 5 (figura 2).



Sabouraud F 10⁻²



BDA F 10⁻²



Czapeck F 10⁻²

Figura 1 - Crescimento microbiano em placas de Petri contendo meios Sabouraud, BDA e Czapeck ajustados em pH 4. Solo de Guararema embolorado.



Sabouraud F 10⁻²



BDA F 10⁻²



Czapeck F 10⁻²

Figura 2 - Crescimento microbiano em placas de Petri contendo meios Sabouraud, BDA e Czapeck ajustados em pH 5. Solo de Guararema embolorado.

Como era de se esperar, observou-se também a presença de um número maior de microrganismos filamentosos nas placas contendo solo aparentemente embolorado do que naquelas contendo solo contaminado de Guararema, sem aparecimento visível dos fungos. O prévio aparecimento dos fungos na primeira amostra pode ser explicado pela permanência do solo em refrigeração, provavelmente, a temperatura mais elevada, permitindo o desenvolvimento de culturas exógenas.

Diferentemente do resultado obtido com o solo embolorado (figuras 1 e 2), a microbiota do solo de Guararema não apresentou nenhum crescimento quando cultivada em meio Czapeck. De uma maneira geral, este meio mostrou-se o menos recomendável para o isolamento dos fungos, tanto em relação ao número de colônias formadas quanto ao seu crescimento tardio.

4.1.1 Técnica do Esgotamento

Foram obtidas colônias com aspecto macroscópico aparentemente homogêneo através da inoculação das culturas pela técnica de esgotamento.

4.2 Determinação da Capacidade de Degradação de Hidrocarbonetos

A presente determinação permitiu a identificação das linhagens que contribuíram na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, diminuindo, desta forma o número de cepas encaminhadas para identificação.

Os resultados da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (HCP) (figuras 3, 4 e 5), ao longo de 7 dias, em meios mineral, mineral com glicose e mineral com extrato de lêvedo (EL) mostraram que a ação microbiana foi estimulada nos meios que continham outras fontes de carbono além do petróleo, acelerando, dessa forma, a degradação do substrato já no 1º dia de cultivo. Esse fato foi bem observado nos meios com EL, que além de fornecer uma fonte de carbono extra para as linhagens, também oferecia fonte de N, vitaminas e sais minerais. Apesar disso, até o 7º dia de cultivo, o efeito degradador dos microrganismos semeados em meio mineral tendeu a igualar-se ao dos microrganismos cultivados nos meios com glicose e EL.

É provável que os microrganismos avaliados no presente experimento possam ter cometabolizado os HCP presentes no meio mineral a eles oferecido, o que pode ser visualmente comprovado pelo considerável desaparecimento parcial da única fonte de carbono. Por outro lado, com algumas exceções, parece não ter havido incorporação do carbono no metabolismo dos fungos, já que aparentemente não houve crescimento celular na maioria das linhagens enquanto o substrato estava sendo transformado. No entanto, nos meios que continham glicose e EL, verificou-se a formação de um emboloramento na superfície do meio e a turvação dos mesmos, podendo comprovar, desta forma, o crescimento microbiano. Isso nos leva a acreditar que os microrganismos possam ter utilizado a segunda fonte de carbono para sustentar o seu crescimento e reprodução enquanto os HCP eram degradados simultaneamente.

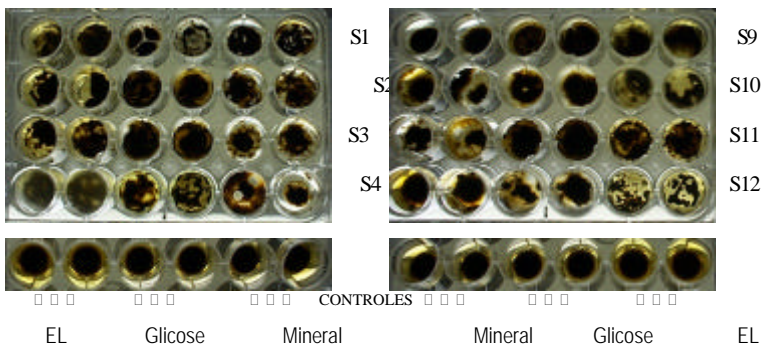


Figura 3 - Degradação de hidrocarbonetos de petróleo em meios mineral, mineral com glicose e mineral com extrato de levedo (EL), de algumas das linhagens cultivadas em meio Sabouraud.

As linhagens que apresentaram pouco ou nenhum efeito degradador sobre os HCP (S28, B14, B15, BL1, BL2, BL3, BL5, BL6, BL7, BL8, BL9, BL10, BL11, Cz2, e Cz15) foram descartadas, não sendo conduzidas para identificação. Porém, é importante destacar que as linhagens descartadas poderiam ser capazes de contribuir em uma segunda etapa de degradação ao auxiliar aquelas com habilidade de metabolizar o substrato inicialmente (ALEXANDER, 1999). Algumas das linhagens citadas acima (S28, B14, BL5, BL6, BL7, BL8, Cz2) mostraram um efeito peculiar sobre os HCP, causando uma compactação da gota de óleo cru, depositada na superfície dos meios, no momento inicial de contato entre a gota de petróleo e a biomassa inoculada; fenômeno possivelmente causado pela repulsão da superfície carregada do microrganismo utilizado pela fonte de carbono hidrofóbica.

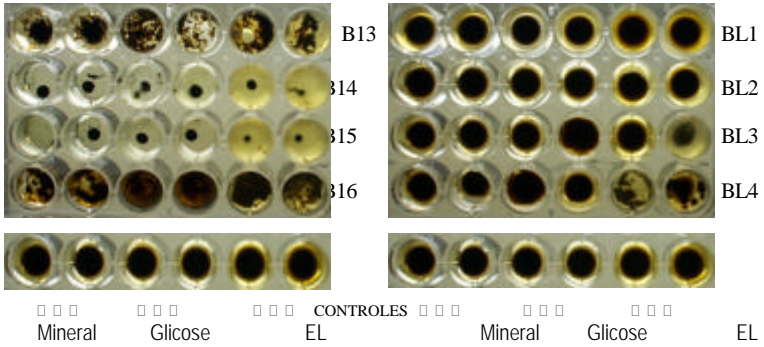


Figura 4 - Degradação de hidrocarbonetos de petróleo em meios mineral, mineral com glicose e mineral com extrato de lêvedo (EL), de algumas das linhagens cultivadas em meio BDA.

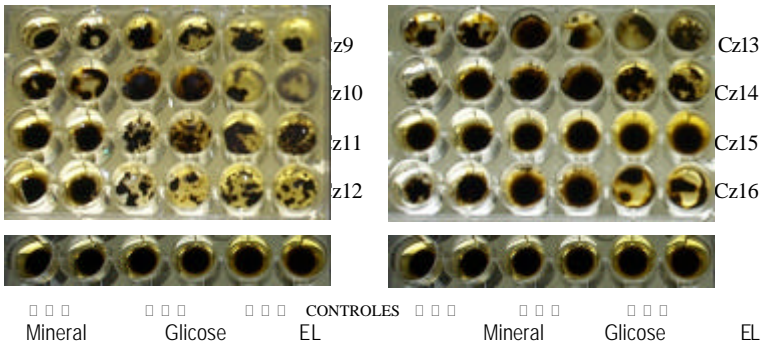


Figura 5 - Degradação de hidrocarbonetos de petróleo em meios mineral, mineral com glicose e mineral com extrato de lêvedo (EL), de algumas das linhagens cultivadas em meio Czapeck.

4.3 Identificação

As linhagens selecionadas foram submetidas à identificação, tendo como resultado a divisão dos microrganismos em 4 gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*. A seguir, na Tabela 3, mostra-se o resultado da identificação e, na Tabela 4 as linhagens em fase de identificação e aquelas que não cresceram durante o plaqueamento inicial, sendo, portanto, abandonadas posteriormente.

Tabela 3 - Linhagens identificadas por espécie

Linhagens	Identificação anterior
<i>Aspergillus terreus</i>	B9, B16, B17, Cz7, Cz10, Cz13, S4, S15, S16, S26
<i>Aspergillus fumigatus</i>	B1, Cz4, S13, S27
<i>Aspergillus versicolor</i>	B6, B18, S1, S12, S17, S18
<i>Aspergillus niveus</i>	B4, B10, B20
<i>Aspergillus niger</i>	S8
<i>Penicillium corylophilum</i>	Cz11, Cz12, B13
<i>Paecilomyces variotti</i>	Cz14, S2, S3, S5, S6, S11 ₂ , S25 ₂
<i>Paecilomyces niveus</i>	Cz6, Cz16, B5, B7, B8, B11, B19, S11 ₁ , S14, S19, S20, S25 ₁
<i>Fusarium sp</i>	B2, BL4, Cz5, S10, S21, S22, S23

Tabela 4 - Linhagens em fase de identificação e descartadas

Linhagens não identificadas	Linhagens descartadas
B3, B12, S7, S24, S29	Cz1, Cz3, Cz8, Cz9

Observando os resultados da Tabela 4 podemos confirmar que o emprego dos distintos meios de cultura utilizados no isolamento dos fungos foi determinante quanto à obtenção de algumas linhagens, especialmente no que diz respeito a *Aspergillus niger* e *Aspergillus niveus*, obtidos especificamente em Sabouraud e BDA, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que, das 75 colônias isoladas do solo contaminado de Guararema, 60 apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo, cuja identificação as agrupou em 4 gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*) subdivididos nas seguintes espécies: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Paecilomyces variotti*, *Paecilomyces niveus* e *Fusarium sp.*

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. (1999). "Biodegradation and Bioremediation", Second edition, Academic Press, New York, 453p.
- ARX, J. A. VON. (1981). "The genera of fungi sporulating in pure culture", 3^d Ed. J. Cramer, Vaduz, Germany.
- BENNETT, J. W., FAISON, B. D. (1997). "Use of fungi in Biodegradation. Em: Manual of Environmental Microbiology", Ed. Christon J. Hurst, J. ASM Press, Washington D. C., USA, p. 758-765.
- BOUCHEZ, M., BLANCHET, D., HÆSELER, F., VANDECASTEELE, J. P. (1996). "Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement", Revue de l'Institut français du pétrole, vol. 51, n° 6, p. 797-828.
- DAVIES, J. S., WESTLAKE, D. W. S. (1979). "Crude oil utilization by fungi", Canadian Journal of Microbiology, vol. 25, n° 12, p. 146-156.
- GERLACH, W., NIRENBERGH, H. (1982). "The genus *Fusarium*, a pictorial atlas", Institut für Mikrobiologie Press, Berlin, Germany.
- NIRENBERG, H. I. (1989). "Identification of *Fusaria* occurring in Europe on cereals and potatos", Em: *Fusarium: Mycotoxins, Taxnomy and Pathogenicity*. J. Chelkowski, Editor, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., p. 170-193.
- PITT, J. I. (1985). "A laboratory guide to common *Penicillium* species", Academic Press, Australia.
- RAPER, K. B., FENNEL, D. I. (1965). "The genus *Aspergillus*", The Williams & Wilks CO., Baltimore, USA.
- RIVALIER, E., SEYDEL, S. (1932). "Nouveau procedé de culture sur lames gélosées appliqué a l'étude microscopique des champignons deteignes", Ann. Parasitol, vol. 10, p. 444-452.
- SUTTON, B. C. (1980). "The Coelomycetes", Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.