

Degradação do corante Azul de Metileno por *Cladosporium* SP isolado de água de lavagem de cana

Natalino Perovano Filho

Departamento de Química e Exatas – UESB

45206-190, Jequié, BA

natalinofilho@gmail.com

Kelly Fernanda Seára da Silva, Ana Maria Queijeiro López

Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL

57072-970, Maceió, AL

kellynanda@yahoo.com.br, amql@qui.ufal.br

Resumo

Entre outros compostos, a lignina é um dos componentes das águas de lavagem de cana para produção de açúcar e álcool. Face à natureza randômica de sua estrutura, enzimas ligninolíticas são capazes de degradar outros compostos recalcitrantes (também aromáticos). Este trabalho visou avaliar a capacidade de fungos isolados das lagoas de decantação da estação de tratamento de efluente (ETE) da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, na safra 2004/05, em degradar o corante Azul de metileno como indicador da produção de Lignina-peroxidases (LiP). Para tanto, utilizou-se um meio de cultivo com 0,01% de Azul de Metileno (AM= cloreto de 3,7-bis-dimetilamino-fenazotônio), para comprovar a produção de LiP através da descoloração desse substrato pela oxidação e, conseqüente demetilação do corante. Avaliou-se também o decaimento da absorvância dos filtrados das culturas, o pH, a condutividade e biomassa (peso seco) no meio. O AM revelou-se um bom marcador da produção de LiP, permitindo a seleção de um fungo (*Cladosporium* sp.) com tal atividade no efluente estudado.

Palavras-chave: Azul de metileno; peroxidase; biorremediação.

Abstract

Among others, the lignin is one of the components of sugarcane washing water for the production of sugar and alcohol. Face to its randomized nature, however, ligninolytic enzymes are able to degrade other recalcitrant compounds (also aromatic). This work aimed to evaluate the ability of fungus isolated from the lagoons of decantation of the effluent treatment station (ETS) of the “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, season 2004/05, in degradate methylene blue dye how indicator of lignin-peroxidases (LiP) production. For that, a growth medium added of 0,01% of Methylene Blue (MB = 3,7-bis-dimethylamine-phenazothionium chloride) was used to evidence the production of LiP through the descolourization of this substratum, by the oxidation and, consequently demethylation of the dye. The decline of the absorbance of the filtered MB-cultures, the pH, conductivity and biomass (dry weight) were also evaluated. The MB showed itself to be a good marker for the production of LiP, allowing the screening of one fungus (*Cladosporium* sp.) that expressed that enzymatic activity in the studied effluent.

Keywords: Methylene blue; peroxidase; bioremediation

Introdução

O objetivo principal do tratamento de afluentes e efluentes é corrigir características indesejáveis, de tal maneira que o seu uso, reuso ou disposição final, possa ocorrer de acordo com as regras e critérios definidos pelas autoridades legislativas (van Haandel & Lettinga, 1994).

A indústria sucro-alcooleira utiliza grandes quantidades de água em vários processos, desde a lavagem da cana (aproximadamente 6 m³/ tonelada de cana moída) à geração de vapor nas caldeiras, sendo 30% de seu consumo médio de água para os multi-jatos, 21% para os condensadores de álcool, 19% para a lavagem de cana, 16% para o resfriamento de dornas e o restante é aplicado em outros equipamentos (Moreno, 2003).

Os efluentes provenientes das atividades dessa indústria, portanto, ainda que separados, apresentam sólidos em suspensão, altos teores de matéria orgânica persistente ou não, e temperatura elevada. Isso pode inviabilizar seu lançamento em corpos d'água ou sua reutilização na própria indústria e/ou na fertirrigação.

Inúmeros autores mostram a utilização de microrganismos ou suas enzimas extracelulares no tratamento de efluentes, para disposição ou reuso (Sirianuntapiboon *et al*, 1988; Nováková *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 1998).

As peroxidases são enzimas com capacidade de catalizar a oxidação de uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (Ferreira-Leitão *et al.*, 2003).

A lignina peroxidase (LiP) de origem fungica é capaz de oxidar complexos de estruturas aromáticas da macromolécula de lignina, bem como de outros compostos xenobióticos, como, por exemplo, clorofenol, clorocatecol antraceno, pireno, benzo- α -pireno perileno, dibenzo-p-dioxina e azocorantes (Field *et al*, 1993).

Devido a essa problemática e a importância da manutenção dos recursos hídricos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação do corante azul de metileno, como indicador da produção de lignina peroxidase, por fungos isolados de amostras das lagoas de decantação do sistema de tratamento de efluentes da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool, (Coruripe-AL), essa capacidade foi avaliada em bioensaios de degradabilidade de composto recalcitrante similar à lignina, que é componente das águas de lavagem de cana da estação de tratamento, e os resultados fazem parte de um projeto global de biorremediação de tais efluentes.

Materiais e métodos

Isolamento e identificação dos fungos

Os fungos foram isolados de amostras dos dois tanques receptores de efluente, da estação de tratamento de efluente (ETE) da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool, nas profundidades de 0-30 e 60-90 cm (Lagoas A e B, **Fig. 1**).

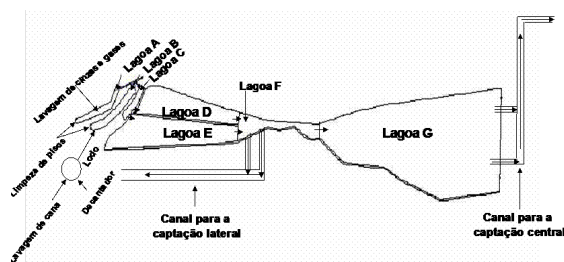


Figura 1. Esquema do sistema de tratamento de efluente (ETE) da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool.

O delineamento experimental fatorial foi de blocos ao acaso, com 3 replicas e 3 repetições, para

cada uma das diluições (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1}) das amostras em água destilada estéril. Uma alíquota de 1 mL dessas diluições foi inoculada em meio ágar-caldo de cana 25%, contido em placas de Petri, espalhada com o auxílio da alça de Drigalski e incubada a 30 ± 1 °C, no escuro. A repicagem individual das colônias dos fungos surgidos foi feita em meio Sabouraud e incubados a 28 ± 1 °C no escuro, para posterior identificação.

Para a identificação dos isolados fungicos surgidos, análises macroscópicas e microscópicas das estruturas fungicas foram efetuadas, conforme Silveira (1995).

Seleção de fungos degradadores do corante AM

Para tal ação utilizou-se um meio sólido com a seguinte composição: glicose, 2 g; tartarato de amônio, 2 g; extrato de malte, 2 g; KH_2PO_4 , 0,26 g; Na_2HPO_4 , 0,26 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0066 g; FeSO_4 , 0,005 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g; NaMoO_4 , 0,02 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,09 mg; H_3BO_3 , 0,07 mg; azul de metileno, 0,1 g; ágar, 20 g; água destilada, 1000 mL.

O teste de seleção realizado foi uma modificação da metodologia desenvolvida por Dhouib *et al.* (2005). Para a verificação da remoção do corante azul de metileno, em meio líquido, foram preparados tubos Falcon (50 mL) contendo 20 mL do meio de seleção, sem adição de ágar. As culturas foram obtidas inoculando-se cada tubo com 100 μL de uma suspensão de $1,95 \times 10^6$ conídios/mL, originando uma concentração final 10^3 conídios/mL/tubo. As culturas foram incubadas a 30 ± 1 °C, sob agitação constante (100 rpm).

Visando estimar a biomassa microbiana, a diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h) procedeu-se a filtração (vácuo) do meio, utilizando-se membrana Millipore com porosidade de 0,45 μm . A biomassa foi obtida mensurando-se o peso seco das membranas filtrantes 12 h após submetê-las a secagem a 50 °C em estufa. Os filtrados foram estocados a 18 °C para posterior análise do decaimento da absorvância do corante presente.

Variação de pH e Condutividade em meio AM

As medidas de pH do meio líquido nos diferentes intervalos foram obtidas utilizando-se pHmetro Quimis (Q-400A), e as condutividades foram mensuradas com o condutivímetro Instrutherm (CD-840). As análises foram obtidas após o processo de filtração e antes da estocagem a 18 °C.

Decaimento da absorvância do corante em meio AM

Foram realizadas leituras espectrofotométricas dos filtrados das culturas armazenados, a 500 nm (Femto, mod 800 XI), após estabilizar a temperatura dos filtrados com a temperatura ambiente.

Resultados e discussão

Isolamento e identificação dos fungos

Foram isolados 3 filamentosos. Conforme as características observadas e as chaves de classificação de fungos (Silveira, 1995), verificou-se que os mesmos são espécies de *Mucor*, *Cladosporium* e *Penicillium* (Figs. 2 e 3).

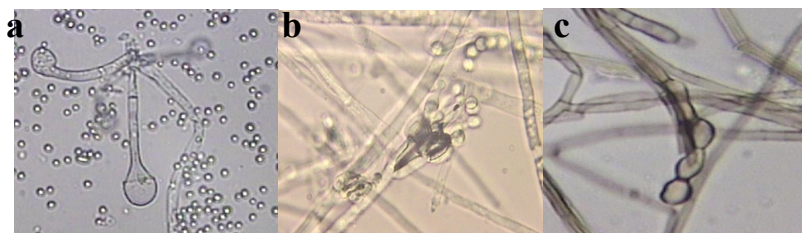


Figura 2. Estruturas microscópicas dos fungos isolados, **a)** *Mucor* sp; **b)** *Penicillium* sp e **c)** *Cladosporium* sp (Aumento 400 X).

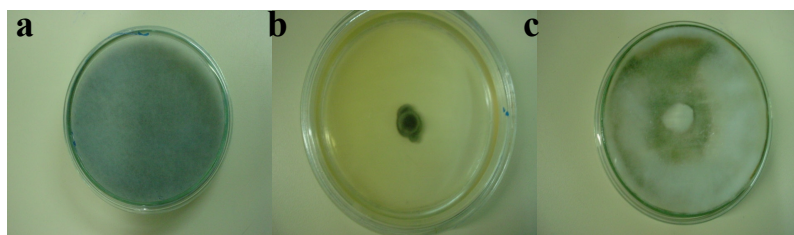


Figura 3. Crescimento dos isolados filamentosos em meio Agar-Sabouraud (15 dias), para a análise macroscópica dos mesmos, **a)** *Mucor* sp; **b)** *Cladosporium* sp e **c)** *Penicillium* sp

Seleção de fungos produtores de lignina peroxidase em meio-AM

Com base no ensaio do crescimento dos isolados fungicos em meio AM, apenas o fungo do gênero *Cladosporium* descoloriu o corante do meio de cultivo (**Fig. 4**).

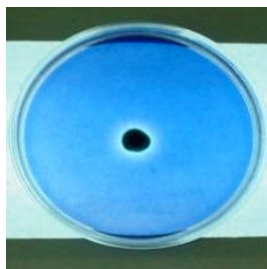


Figura 4. Degradação do corante azul de metileno produzida por *Cladosporium* sp.

Dhouib *et al.* (2005) verificaram que microrganismos produtores de lignina peroxidase modificam a coloração do corante Poly R-478 de roxo para amarelo ou descolorem completamente o mesmo. A substituição pelo azul de metileno foi realizada com base no trabalho desenvolvido por Ferreira-Leitão *et al.* (2003), onde se observou que a lignina peroxidase oxida o azul de metileno, podendo ocorrer descoloração do mesmo devido à clivagem do anel aromático e pela metodologia proposta por Dhouib *et al.* (2005), onde a descoloração do corante Poly R-478 também ocorre pela clivagem do anel aromático.

Variação do pH, condutividade, peso seco e absorvância das culturas em AM

Um decréscimo na absorvância das culturas isentas de células (**Fig. 7**), a partir de 96 h, indicou que uma vez adaptado à substância recalcitrante (AM) o fungo provavelmente passou a expressar as enzimas degradadoras da mesma e, juntamente com os demais nutrientes, utilizou-a para seu desenvolvimento (Kononova e Nesmeyanova, 2002).

A condutividade elétrica (**Fig. 6**) das culturas de *Cladosporium* sp em meio AM diminuiu durante

as primeiras 48 h de cultivo, elevando-se ligeiramente até 72 h, e permanecendo constante a partir de então. Também verificou-se que o pH das culturas (**Fig. 6**) diminuiu mais expressivamente nas 48 h iniciais de incubação, e após 96 h, face à liberação de íons H^+ a partir da oxidação do corante e formação de metanol.

Durante a ação de enzimas lignolíticas, espécies radiculares intermediárias são formadas (**Fig. 5**), o que está relacionado com o aumento temporário de íons, e, portanto, da condutividade (Kapich *et al.*, 1999).

Yesilada *et al.* (1998), observaram decréscimo do pH nas primeiras 48 h de cultivo de *Coriolus versicolor* em meio contendo o corante *Orange II*, seguindo-se um ligeiro aumento desse pH até 72 h. O mesmo comportamento foi observado no cultivo do isolado XXI (*Cladosporium* sp) aqui estudado.

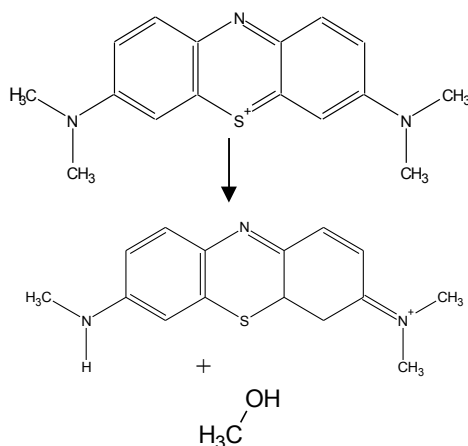


Figura 5. Proposta da reação geral da degradação de Azul de metileno por LiP, sem indicação das espécies intermediárias.

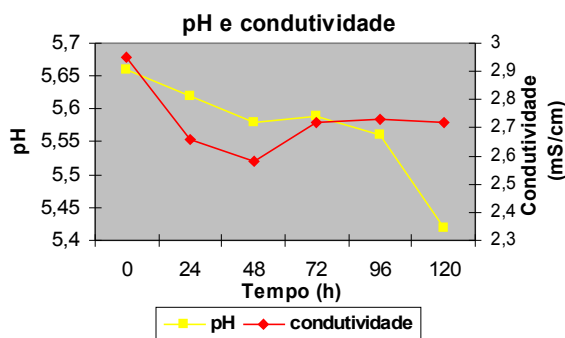


Figura 6. Variação do pH e condutividade no decurso de tempo de culturas de *Cladosporium* sp em meio contendo o corante azul de metileno.

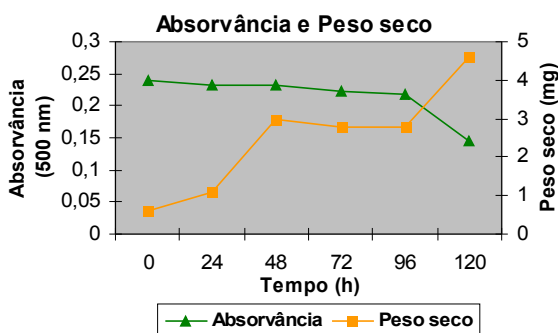


Figura 7. Variação da Absorvância e peso seco no decurso de tempo de culturas de *Cladosporium* sp

em meio contendo o corante azul de metileno.

Conclusões

Três fungos filamentosos (químio-heterotrófico, aeróbios estritos) foram isolados de amostras das lagoas de decantação de efluentes da ETE da S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool e identificados como espécies de *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp e *Mucor* sp

O azul de metileno revelou-se um ótimo substituto para o corante Poly R 478, no método de seleção de microrganismos produtores de LiP. O isolado de *Cladosporium* sp, obtido do efluente das lagoas de decantação da ETE estudada, apresentou degradação do corante azul de metileno, o que pode ser indicativo de atividade LiP positiva. Tal perfil revela, que o isolado de *Cladosporium* sp é promissor para estudos de bioaumentação dessa ETE, para a sua biorremediação, caso oxigênio se faça disponível e a relação entre C:N:P seja de pelo menos 100:5:1.

Agradecimentos

S. A. USINA CORURIBE AÇÚCAR E ÁLCOOL, FINEP-CTHidro/CNPq, CNPq, BNB-FUNDECI.

Referências

- [1] A. Dhoub, M. Hamza, H. Zouari, T. Mechichi, R. H'midi, M. Labat, S. Sayadi, Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities form Tunisian biotopes, *African Journal of Biotechnology*, 4 (2005) 431-436.
- [2] V. S. Ferreira-Leitão, J. G. Silva, E. P. S. Bon, Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II e class III peroxidases, *Applied Catalysis B: Environmental*, 42, (2003) 213-221.
- [3] J. A. Field, E. de Jong, G. Feijoo-Costa, J. A. M. de Bont, Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in biotechnology*, 11 (1993) 44-49.
- [4] A. N. Kapich, K. A. Jensen, K. E. Hammel, Peroxyl radicals are potencial agents of lignin biodegradation, *FEBS letters*, 461 (1999) 115-119.
- [5] S. V. Kononova, M. A. Nesmeyanova, Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry*, 67 (2002) 184-195.
- [6] V. Kumar, L. Waiti, P. Nigam, I. M. Banat, B. S. Yadav, D. Singh, R. Marchant, Decolorization and biodegradation of an anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. *Process Biochem.*, 33 (1998) 83-88.
- [7] A. Moreno, A Indústria sucro-alcooleira utiliza em média 20 m³ de água por tonelada de cana. *Jornal da Cana* (31/03/2003), 2003.
- [8] H. Nováková, M. Vošahlíková, J. Pazlarová, M. Macková, J. Burkhard, K. Demnerová, PCB metabolism by *Pseudomonas* sp. P2, *International biodegradation & biodegradation*, 50 (2002) 47-54.
- [9] V. D. Silveira, "Micologia", 5 ed., 336 p. Âmbito cultural editora, 1995.
- [10] S. Sirianuntapiboon, P. Somchai, P. Sihanonth, P. Atthasampunna, S. Ohmomo, Screening of filamentous fungi having the ability to decolorize molasses pigments. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (1988)

387-392.

[11] A. C. van Haandel, G. Lettinga, “Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente”, 354 p., 1994.

[12] O. Yesilada, B. Özcan, Decolorization of Orange II Dye With the Crude Culture Filtrate of White rot Fungus, *Coriolus versicolor*, *Turkey Journal of Biology*, 22 (1998) 463-476.