

ECOLOGIA DOS FUNGOS

Editores

Isabel M. Santos
Armando Venâncio
Nelson Lima



mum

Microbiologia da Universidade do Minho



Esta publicação reúne as conferências e as comunicações apresentadas no encontro *Um dia sobre... A Ecologia dos Fungos* realizado a 13 de Dezembro de 2002 na Universidade do Minho, Braga, Portugal.

O texto integral que aqui se apresenta é da responsabilidade dos respectivos autores e não reflecte necessariamente a posição ou opinião da Micoteca da Universidade do Minho.

A Micoteca da Universidade do Minho agradece o apoio dado à edição desta obra à seguinte entidade:

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DO ENSINO SUPERIOR

Portugal

Apoio do programa Operacional Ciência, Tecnologia,
Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III

Ficha Técnica

Ecologia dos Fungos

Editores: Isabel M. Santos
Armando Venâncio
Nelson Lima

Edição: Micoteca da Universidade do Minho

Capa: Zapruder, Composição Gráfica e Design, Lda. - Porto

Execução Gráfica: Barbosa & Xavier, Lda., Artes Gráficas - Braga

Tiragem: 300 exemplares
Braga, Dezembro 2002

Depósito Legal: 188789/02

ISBN: 972-97916-1-9

Distribuição: Livraria Minho – Ferreira & Salgado, Lda
Largo da Senhora-a-Branca, 66
4710-443 Braga

Estudo de corantes azo bioacessíveis para aumentar o desempenho da biorremediação fúngica

M. Adosinda M. Martins, M. João Queiroz, Nelson Lima

Instituto de Biotecnologia e Química Fina - IBQF, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

e-mail: nelson@iec.uminho.pt

Introdução

As questões de impacte ambiental têm vindo a impor-se na sociedade actual e a procura de respostas eficazes a este tipo de problemas denota-se em diversas áreas de investigação. O desenvolvimento do conhecimento sobre a biorremediação (Alexander, 1994; Pointing, 2001) é um exemplo da importância que se tem atribuído às tentativas de redução e eliminação de diversos poluentes (Fig. 1).

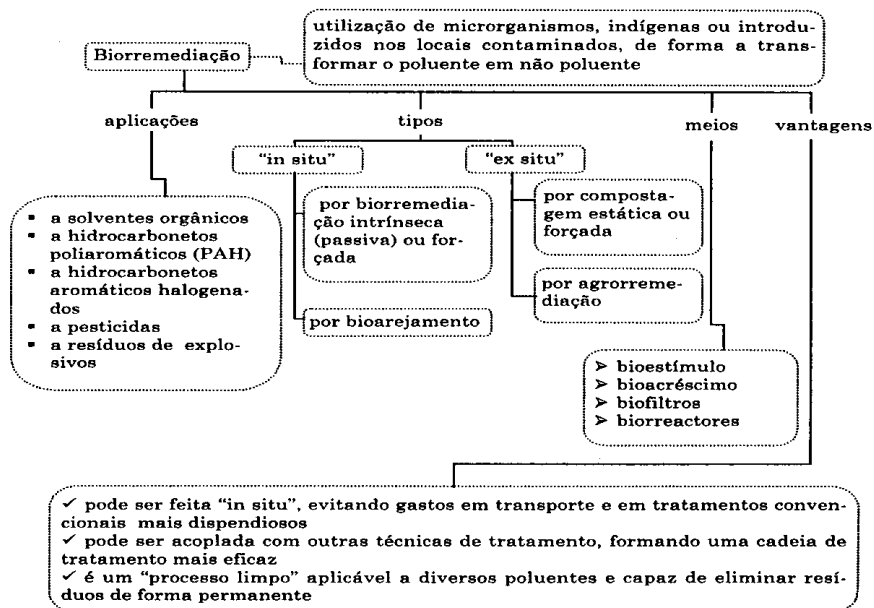


Figura 1. Conceitos relacionados com os processos de biorremediação.

As repercussões de um problema de impacto ambiental são muito diversificadas, o que acresce em complexidade qualquer processo de biorremediação que se pretende eficaz. Contudo, logo à partida podem ocorrer diversos processos (Fig. 2) que contribuem para a "atenuação ou recuperação natural" da área contaminada.

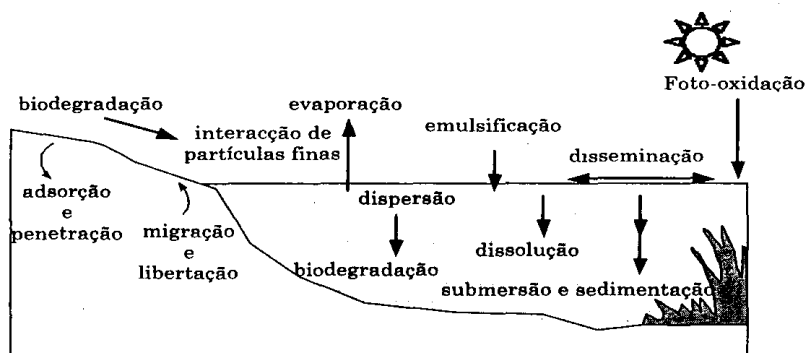


Figura 2. Diversidade de processos a ter em consideração depois de um derrame de petróleo (adaptado de Zhu *et al.*, 2001).

Os derrames de petróleo constituem graves problemas de impacto ambiental, embora já se reconheçam microrganismos capazes de atenuar esta situação, como é o caso de diferentes espécies de bactérias, nomeadamente do género *Bacillus*, de leveduras, particularmente do género *Candida* e de fungos filamentosos de diversos géneros, como *Aspergillus* e *Penicillium* (Zhu *et al.*, 2001). Na realidade, têm sido efectuados vários processos de biorremediação com resultados positivos, tanto a nível de zonas costeiras como do solo (Fig. 3).

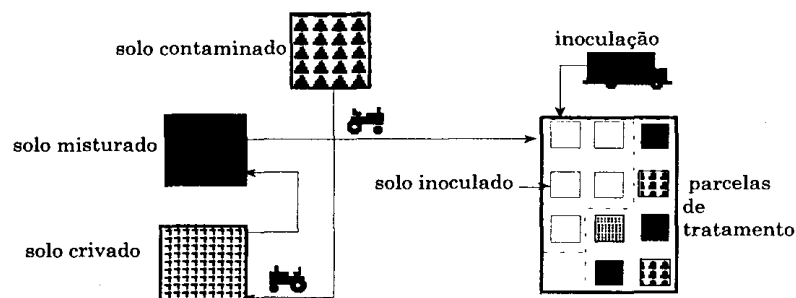


Figura 3. Esquema da preparação do solo num caso real de biorremediação com fungos lenhínicos, *Phanerochaete chrysosporium* e *P. sordida* (adaptado de EPA, 1995).

Na biorremediação do solo, os fungos lenhínicos, como *Phanerochaete chrysosporium* (EPA, 1995), *Pleurotus ostreatus* (Eggen, 1999) e *Trametes versicolor* (Tuomela *et al.*, 1999), têm revelado potencialidades particularmente significativas, permitindo atingir resultados mais eficazes do que as próprias bactérias indígenas (Gramss *et al.*, 1999). Estes fungos apresentam um sistema enzimático não específico, o que faz com que, para além da lenhina, outros compostos aromáticos também sejam susceptíveis de serem biodegradados por estes microrganismos (Fig. 4). Alguns destes compostos fazem parte da lista de poluentes considerados prioritários, onde se incluem certos corantes e o benzo(a)pireno, que pertencem ao conjunto de compostos orgânicos representativos do crude, cujo derame tem constituído um problema sério de impacto ambiental a biorremediar.

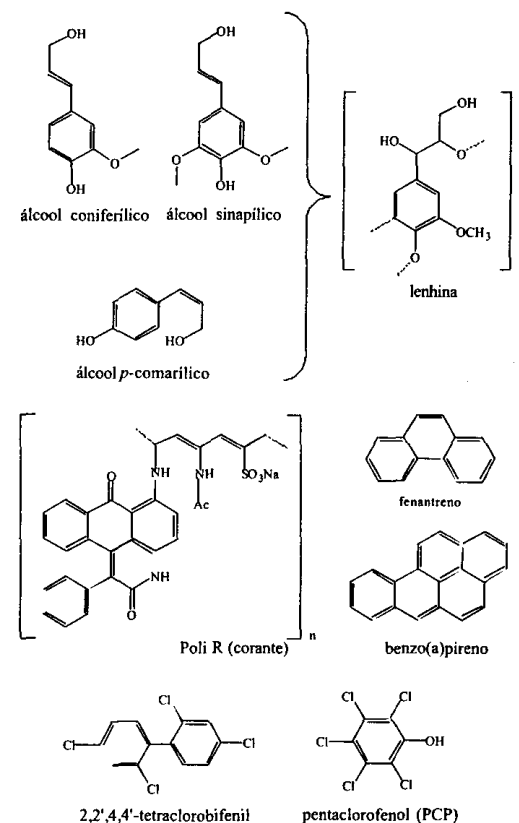


Figura 4. Compostos aromáticos passíveis de serem degradados por enzimas lenhínicas, presentes nos fungos da podridão branca (adaptado de Pointing, 2001).

Tendo em consideração os aspectos focados, perspectivam-se potencialidades na eficácia de uma crescente aplicação de fungos lenhícolíticos na biorremediação. No caso particular da degradação de corantes, tanto a utilização de leveduras como de fungos filamentosos tem permitido alcançar resultados positivos. A título de exemplo, poder-se-á referir que em trabalhos já efectuados com a levedura *Candida zeylanoides*, isolada de um efluente têxtil (Martins *et al.*, 1999) e com os fungos lenhícolíticos *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* ou *T. versicolor*, da colecção de culturas da Micoteca da Universidade do Minho (MUM), conseguiu-se a descoloração de meios líquidos contendo diferentes corantes azo de aplicação têxtil (Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002).

A utilização dos fungos, em particular, desencadeia diversos mecanismos oxidativos que permitem a degradação de diferentes corantes sem a formação de anilinas carcinogénicas e/ou mutagénicas, resultantes da redução dos corantes azo pelas bactérias. Considerando os resultados obtidos no trabalho que tem sido desenvolvido, fica em aberto a possibilidade de destes microrganismos poderem vir a ser aplicados no biotratamento de efluentes da indústria têxtil e na biorremediação de ambientes poluídos por descargas desses mesmos efluentes.

A “Química verde” como ponto de partida

Os compostos azo, que se caracterizam pela presença do grupo cromóforo -N=N-, foram dos primeiros compostos sintetizados, tendo sido utilizados como corantes na indústria têxtil. Actualmente, existem milhares destes corantes, utilizados em grande escala e com aplicações muito diversificadas, nomeadamente, nas indústrias têxteis, alimentares, de papel e de cosméticos.

Os corantes utilizados no trabalho efectuado são corantes reactivos, o que permite que, durante o processo de tingimento, se estabeleçam ligações covalentes entre o corante e a fibra, evitando perdas significativas deste. Para além deste aspecto importante, tanto em termos económicos como em termos ambientais, é de referir o interesse na síntese destes corantes que apresentam grupos bioacessíveis aos fungos lenhícolíticos, guaiacol ou siringol (Fig. 5).

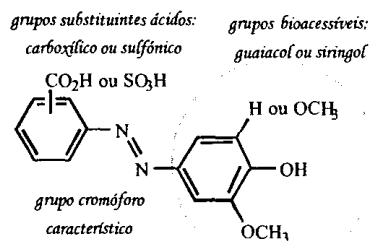


Figura 5. Estrutura química geral dos corantes azo utilizados neste trabalho.

Os grupos bioacessíveis referidos existem na estrutura química da lenhina (Fig. 6) e funcionam como um ponto de acesso para as enzimas lenhícolíticas. Isto constitui, o que se tem vindo a denominar de “Química verde”, que se pode traduzir no trabalho de síntese de compostos não poluentes, cujo “desenho químico” facilita a sua transformação e degradação.

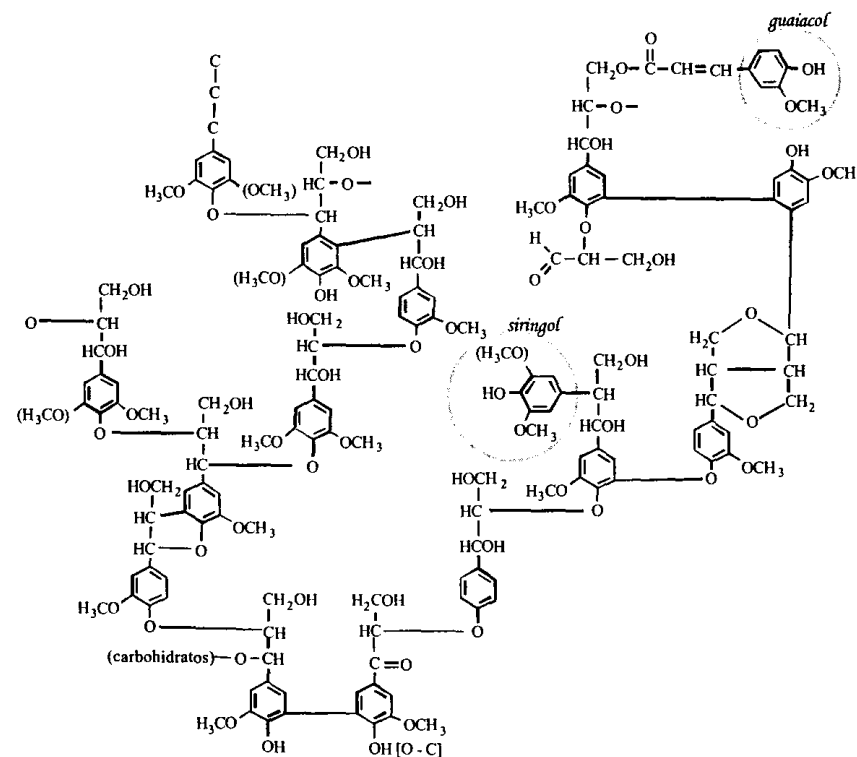


Figura 6. Estrutura química da lenhina, assinalando-se os grupos bioacessíveis, guaiacol e siringol, também presentes na estrutura dos corantes utilizados neste trabalho.

Dos oito “corantes verdes” sintetizados (Martins *et al.*, 2001), o corante designado por Cm-s, com o grupo carboxílico (C) em posição *meta* (m) em relação à ligação azo e com siringol (s) como grupo bioacessível (Fig. 5), foi a estrutura química mais facilmente biodegradada pelos fungos lenhícolíticos utilizados (Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002), nomeadamente pela estirpe de *P. chrysosporium* MUM 95.01 (Fig. 7).

Os resultados obtidos apontam para a biodegradação, atendendo a que não ocorreram fenómenos de fotodegradação ou de adsorção do corante à biomassa, verificando-se ainda a descoloração do meio de cultura líquido (Fig. 7) e o facto dos valores da concentração da biomassa terem superado os valores alcançados no respectivo controlo sem corante (Fig. 8 e Fig. 9).

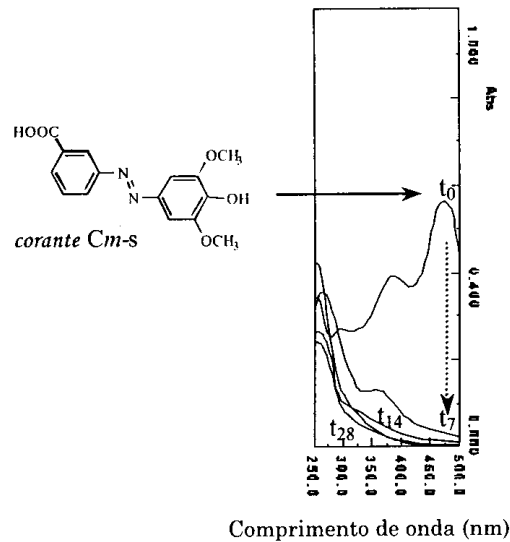


Figura 7. Descoloração do meio de cultura líquido (100 mL) contendo Cm-s (50 ppm), a partir da inoculação com *P. chrysosporium*, pré-adaptado ao próprio corante (Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002). Os espectros de UV-Vis foram registados a partir das amostras recolhidas após a inoculação - t_0 e ao fim de 7, 14, 21 e 28 dias de incubação a 30 °C e 150 rpm. A seta indica a tendência para o decréscimo da absorvância (Abs) no comprimento de onda máximo do corante.



Figura 8. Comparação entre a biomassa desenvolvida, ao fim de 7 dias de incubação a 30 °C e 150 rpm, em meio de cultura líquido (100 mL) com corante (Cm-s) e sem corante (controlo), utilizando *P. chrysosporium* pré-adaptado a Cm-s.

O aumento da concentração da biomassa verificou-se mesmo depois de ter ocorrido o desaparecimento total da sacarose (Fig. 9), utilizada como fonte de carbono inicial, numa situação de cometabolismo (Martins *et al.*, 2001).

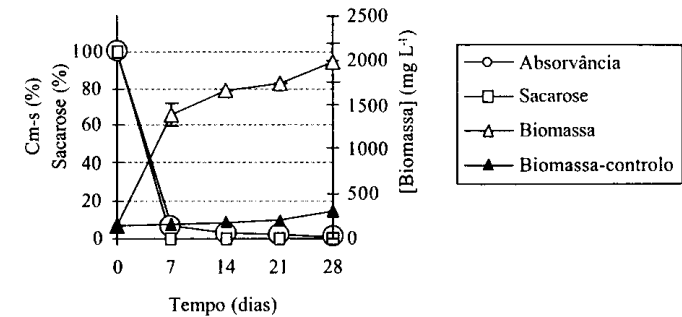


Figura 9. Variação da descoloração do meio de cultura líquido contendo Cm-s, da sacarose e da biomassa nesse meio e no respectivo meio de controlo sem corante, utilizando *P. chrysosporium* pré-adaptado a Cm-s.

Considerando os resultados obtidos, em que se observou a maior taxa de descoloração ao fim de sete dias de incubação, decidiu-se proceder à análise por cromatografia gasosa de espectrometria de massa (GC-MS) das amostras recolhidas ao fim de 1, 3, 5 e 7 dias de incubação, repetindo os ensaios num volume maior como era conveniente a este tipo de análise. Verificou-se que mesmo a uma escala maior, *P. chrysosporium* foi capaz de permitir alcançar a descoloração do meio, o que aponta para a possibilidade deste fungo poder vir a ser aplicado numa situação real de biotratamento de efluentes industriais têxteis ou de biorremediação de zonas poluídas por estes efluentes quando não tratados correctamente.

Processos oxidativos na biodegradação de corantes azo por fungos lenhicolíticos

Atendendo a que uma das condições para aplicar a biorremediação diz respeito ao reconhecimento de que os processos utilizados não conduzem à formação de produtos com efeitos nefastos sobre o ecossistema (Swannell *et al.*, 1996), procedeu-se à identificação dos metabolitos resultantes da biodegradação dos corantes pelo fungo utilizado. A análise por GC-MS do extracto derivatizado (trimetilsilil) da amostra recolhida ao fim de sete dias de incubação do meio de cultura contendo Cm-s, permitiu a identificação de um metabolito de referência (Martins *et al.*, 2002). Este composto, um derivado nitroso do catecol, resultou da quebra oxidativa da ligação azo do corante (Fig. 10).

A partir da amostra recolhida ao fim de 14 dias de incubação do meio de cultura contendo *Cm-s*, procedeu-se ao teste da clivagem *meta/orto* do catecol ou derivados (Stanier & Orston, 1973), tendo-se detectado a formação de β -ceto adipato (Martins *et al.*, 2002), resultante da actividade enzimática da 1,2-dioxigenase (E.C. 1.13.1.1) que conduz à clivagem *orto* do anel aromático (Fig. 10). Os resultados obtidos permitiram a proposta de uma via metabólica, incluindo a possibilidade da mineralização do corante (Fig. 10).

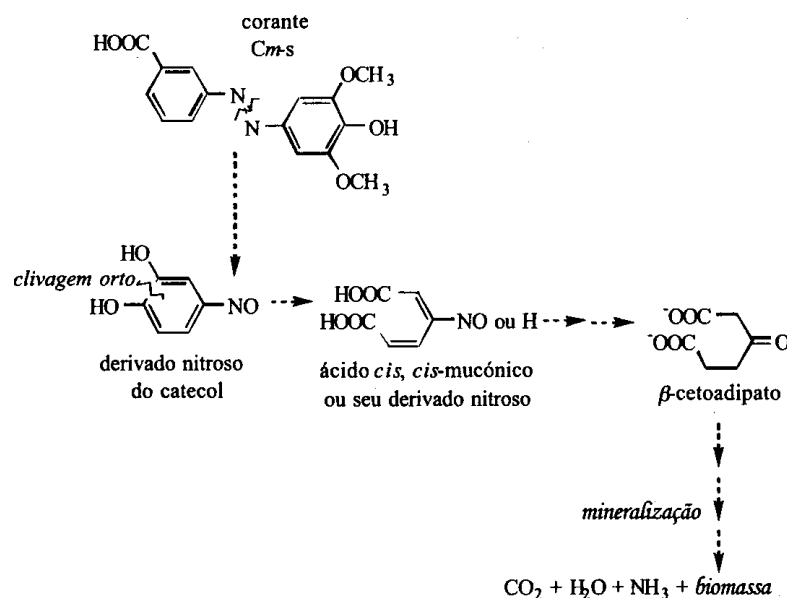


Figura 10. Via metabólica proposta para o derivado do catecol, resultante da biodegradação do corante *Cm-s* por *P. chrysosporium* pré-adaptado ao próprio corante, onde se apresenta a possibilidade de ocorrer mineralização (Martins *et al.*, 2002).

Descoloração de um efluente têxtil simulado com corantes azo bioacessíveis

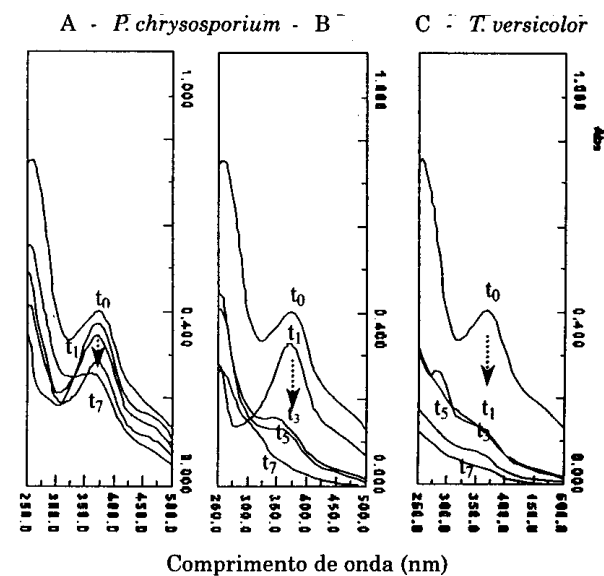
Atendendo às potencialidades demonstradas por *P. chrysosporium* na descoloração do meio de cultura líquido contendo cada um dos corantes (Martins *et al.*, 2002), decidiu-se simular um efluente têxtil misturando os oito corantes e utilizar o mesmo fungo sob diferentes condições optimizadas.

Verificou-se que também no caso do efluente simulado, para além da descoloração do meio, a biomassa se desenvolveu mais no efluente do que no controlo sem corantes, apontando para a ocorrência de biodegradação.

Apesar dos resultados obtidos serem elucidativos quanto às potencialidades deste fungo, procurou-se optimizar as condições de biodegradação dos corantes misturados a simular um efluente têxtil. Tendo sido confirmada a importância do meio de pré-crescimento do fungo a ser utilizado como inóculo (Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002), depois de se ter adaptado o fungo ao corante mais facilmente biodegradado, *Cm-s*, decidiu-se fazer a pré-adaptação ao corante que tinha possibilitado atingir percentagens mais elevadas de descoloração do meio de cultura contendo cada um dos corantes (Martins *et al.*, 2001). Esse corante, designado por *Sm-g*, contém na sua estrutura química um grupo sulfónico (S) em posição *meta* (m) em relação à ligação azo e o guaiacol (g) como grupo bioacessível. Desta forma, foi possível verificar que com este corante também foi possível atingir percentagens mais elevadas de descoloração (99%) do efluente simulado (Fig. 11).

Por outro lado, tendo-se confirmado as potencialidades de outros fungos lenhícolas e, nomeadamente, a maior eficácia da estirpe *T. versicolor* MUM 94.04 na descoloração do meio de cultura líquido contendo cada um dos corantes, decidiu-se comparar o desempenho de *P. chrysosporium* e de *T. versicolor* na descoloração do efluente simulado (Fig. 11).

Figura 11. Comparação entre a descoloração do efluente simulado, utilizando *P. chrysosporium* pré-adaptado a *Cm-s* (A) ou a *Sm-g* (B), ou *T. versicolor* pré-adaptado a *Sm-g* (C), através dos espectros de UV-Vis que foram registados a partir das amostras recolhidas ao fim de 1, 3, 5 e 7 dias de incubação. A seta indica a tendência para o decréscimo da absorvância (Abs) no comprimento de onda máximo da mistura dos 8 corantes que constituíam o efluente.



Verificou-se que tal como aconteceu com *P. chrysosporium*, tanto no caso do meio de cultura líquido contendo um só corante como no caso do efluente simulado com os oito corantes, a utilização de *T. versicolor* permitiu registar a descoloração do meio e um maior desenvolvimento da biomassa em relação ao controlo, sem que tivesse ocorrido a formação de complexos de adsorção do corante à biomassa ou a fotodegradação dos corantes ao longo do ensaio.

Em termos comparativos, *T. versicolor* permitiu atingir mais rapidamente percentagens de descoloração do efluente simulado superiores às que se obtiveram a quando da utilização de *P. chrysosporium* (Fig. 12).

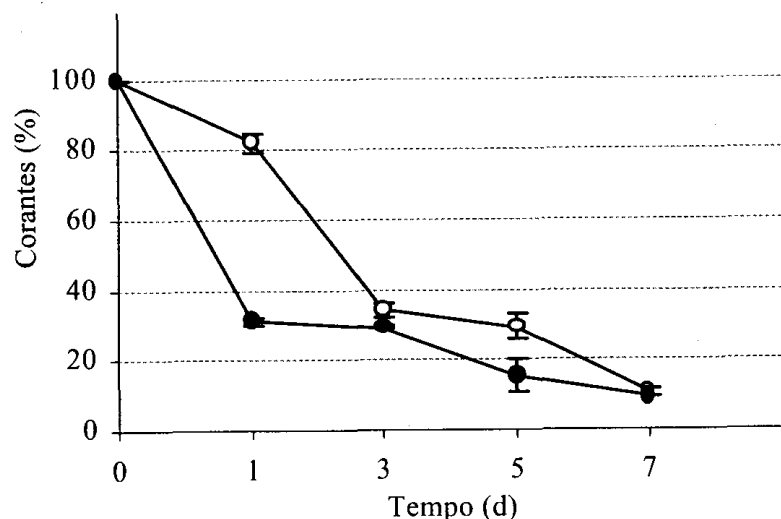


Figura 12. Comparação entre a descoloração do efluente simulado utilizando *P. chrysosporium* (○) ou *T. versicolor* (●), ambos pré-adaptados ao corante Sm-g.

As diferenças registadas poderão, possivelmente, ser atribuídas à actuação por parte do conjunto específico de enzimas que cada uma das estirpes produz. É de referir que, em particular, a actuação da lacase assume um papel relevante na biotransformação dos corantes, mas que a sua actividade, ao contrário de *T. versicolor*, não foi detectada em *P. chrysosporium* (Martins *et al.*, 2002), uma estirpe que se considera ser não produtora da lacase (Podgornik *et al.*, 2001).

Considerações finais / perspectivas futuras

Os fungos utilizados permitiram alcançar a descoloração do meio líquido com cada um dos corantes e do efluente simulado com os vários corantes misturados. Confirmou-se a ocorrência de biodegradação, com a formação de compostos mais simples, cuja via metabólica aponta para a mineralização.

Considerando os resultados obtidos poder-se-á reafirmar as potencialidades dos fungos lenhicolíticos em termos de biodegradação de corantes azo e as perspectivas crescentes de os considerar como organismos promissores em processos de biorremediação, nomeadamente, em rios contaminados por efluentes industriais têxteis.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Mestre Isabel Ferreira pela síntese dos corantes azo, ao Professor Doutor Armando Silvestre, da Universidade de Aveiro, pela sua colaboração nos resultados obtidos por GC-MS e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), que financiou a bolsa Praxis XXI/BD/15878/98 de M. Adosinda M. Martins.

Bibliografia

- Alexander M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, Boston.
- Eggen T. (1999). Application of fungal substrate from commercial mushroom production – *Pleurotus ostreatus* – for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 44: 117-126.
- EPA (1995). Bioremediation field initiative site profile: Escambia wood preserving site. United States Environmental Protection Agency (EPA), Office of Research and Development & Office of solid waste and Emergency response, Washington.
- Gramss G., Voigt K.D. & Kirsche B. (1999). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*, 10: 51-62.
- Martins M.A.M., Cardoso M.H., Queiroz M.J., Ramalho M.T. & Campos A.M. (1999). Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. *Chemosphere*, 38: 2455-2460.
- Martins M.A.M., Ferreira I.C., Santos I.M., Queiroz M.J. & Lima N. (2001). Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 89: 91-98.
- Martins M.A.M., Queiroz M.J., Silvestre A.J.D. & Lima N. (2002). Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Research in Microbiology*, 153: 361-368.

- Podgornik H., Stegu M., Zibert E. & Perdih A. (2001). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* – an artefact caused by Mn(III)? *Letters in Applied Microbiology*, 32: 407-411.
- Pointing S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33.
- Stanier R.Y. & Orston L.N. (1973). The β -ketoadipate pathway. *Advanced Microbiology and Physiology*, 9: 89-151.
- Swannell R.P.J., Lee K. & McDonagh M. (1996). Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60: 342-365.
- Tuomela M., Lytikainen M., Oivanen P. & Hatakka A. (1999). Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 65-74.
- Zhu X., Venosa A.D., Suidan M.T. & Lee K. (2001). Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. *U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory, Land Remediation & Pollution Control Division, Cincinnati.*