

13º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2022

Fungos filamentosos resistentes a efluente contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico e fenol com potencial para biodegradação.

J. C. D. VIDOTTO¹, M. P. BAGAGLI²

¹ Graduando em Engenharia de Biossistemas, Bolsista PIBISFP, IFSP, Campus Avaré, jessica.vidotto@aluno.ifsp.edu.br

² Docente do Curso de Engenharia de Biossistemas, IFSP, Campus Avaré, marcela.bagagli@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.02-8 Microbiologia industrial e fermentação

RESUMO: A análise de açúcares redutores (AR) pelo método do DNS é amplamente utilizada em laboratórios de análises químicas, bioquímicas e de alimentos. Nesse método o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fenol são reagentes, sendo assim, o efluente da análise não pode ser descartado na rede de esgoto. Desse modo, este trabalho visou encontrar possíveis microrganismos com potencial para degradar o efluente de análises de AR pelo método de DNS, através de triagem de fungos filamentosos cultivados no efluente. Os fungos utilizados no estudo pertencem às espécies *Aspergillus oryzae* e *Sclerotinia sclerotiorum* e foram avaliados na triagem de tolerância ao efluente. Concluiu-se que ambas as espécies sobreviveram após exposição prolongada ao efluente, no entanto, o *A. oryzae* mostrou-se inviável para a biodegradação visto que não apresentou crescimento satisfatório em presença de resíduo; já o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou crescimento considerável em presença do resíduo, mostrando-se um microrganismo potencial para biodegradação do efluente.

PALAVRAS-CHAVE: DNS; biodegradação; fenol; nitrofenólicos; *Aspergillus oryzae*; *Sclerotinia sclerotiorum*.

Filamentous fungi resistant to effluent containing 3,5-dinitrosalicylic acid and phenol, with potential for biodegradation.

ABSTRACT: The analysis of reducing sugars (AR) by the DNS method is widely used in chemical, biochemical and food analysis laboratories. In this method, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and phenol are reagents, so the effluent from the analysis cannot be discharged into the sewage system. Thus, this work aimed to find possible microorganisms with the potential to degrade the effluent from AR analysis by the DNS method, by screening filamentous fungi grown on the effluent. The fungi used in the study belong to the species *Aspergillus oryzae* and *Sclerotinia sclerotiorum* and were evaluated in screening for tolerance to the effluent. It was concluded that both species survived after prolonged exposure to the effluent, however, the *A. oryzae* showed to be unfeasible for biodegradation since it did not show satisfactory growth in the presence of waste, while the *Sclerotinia sclerotiorum* fungus showed considerable growth in the presence of waste, showing to be a potential microorganism for biodegradation of the effluent.

KEYWORDS: DNS; biodegradation; phenol; nitrophenolics; *Aspergillus oryzae*; *Sclerotinia sclerotiorum*.

INTRODUÇÃO

A utilização de análises químicas é frequente em laboratórios de ensino, pesquisas ou diagnósticos, as quais muitas vezes produzem efluentes que podem ser prejudiciais ao meio ambiente

se lançados na rede de esgoto ou encaminhados para aterros sanitários sem tratamento (PAGNO *et al.*, 2003). Dentre ensaios químicos, a análise de açúcares redutores é rotineira, sendo um método colorimétrico que permite o uso de baixos volumes reacionais quando comparada à outras metodologias.

O método colorimétrico descrito por Miller (1959) utiliza como reagente o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em meio básico e em presença de fenol, sendo que o DNS é reduzido pelos açúcares redutores formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e ácidos aldônicos. Entretanto, os compostos fenólicos presentes na reação são recalcitrantes e nocivos ao meio ambiente, não podendo o efluente dessa análise, ser descartado diretamente na rede de esgoto sem tratamento.

Desse modo, a aplicação de organismos vivos e seus produtos têm obtido destaque recentemente na degradação de compostos recalcitrantes, incluindo compostos fenólicos presentes em efluentes (ABIRAMI, 2013; CHAUSSONNERIE *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2018). Santos e Linard (2004) isolaram, de efluentes de indústria metalúrgica, linhagens de *Fusarium sp.* e *Graphium sp.* tolerantes à fenol e capazes de degradar compostos fenólicos em até 75% da concentração em 168h. A biodegradação do DNS pelo o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi reportada por Madaj *et al.* (2018), sendo observada redução próxima a 50% da concentração inicial após 4 semanas de incubação.

Este estudo visou encontrar possíveis microrganismos degradadores do efluente de análises de açúcares redutores pelo método de DNS, através de triagem de fungos filamentosos capazes de se desenvolver neste efluente.

MATERIAL E MÉTODOS

O efluente da análise de açúcares redutores foi obtido no laboratório de química e análise de alimentos do Instituto Federal de São Paulo, Câmpus Avaré, sendo reservado em um lote com volume suficiente para realização de todos os ensaios propostos.

Os fungos utilizados no estudo de triagem de tolerância ao efluente pertencem às espécies *Aspergillus oryzae* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

A cepa de *Aspergillus oryzae* utilizada foi gentilmente doado pelo laboratório de bioprocessos, departamento de química e ciências biológicas do instituto de biociências da UNESP – Botucatu e mantida no banco de microrganismos do laboratório de microbiologia do Instituto Federal de São Paulo, Câmpus Avaré, estando conservada em *slants* de ágar batata dextrose (PDA) recobertos por vaselina líquida sob refrigeração (5°C). Antes da utilização nos experimentos, o fungo foi transferido para placas de Petri contendo ágar PDA e incubadas a 28°C até completa esporulação.

A cepa de *Sclerotinia sclerotiorum* isolado ssc 03 utilizada foi gentilmente cedido pelo Dr. Ricardo Gioria da *Sakata Seed Sudamerica*. Antes da utilização nos experimentos, o fungo foi transferido para placas Petri contendo ágar PDA e incubadas a 28°C até recobrimento da placa.

Os dois fungos foram submetidos ao efluente adicionado de diversas concentrações de sacarose (0, 5, 10, 15 e 20% m/v) e solidificados com ágar bacteriológico a 2% (m/v) em placas de Petri esterilizadas.

Após o preparo dos meios de cultura, os fungos foram inoculados, sendo que o *Aspergillus oryzae* foi semeado utilizando Swab estéril, recobrando a superfície do meio de cultura contendo o efluente. E a *Sclerotinia sclerotiorum* foi semeada usando alça microbiológica para implantar um pequeno fragmento de cultura na superfície do meio de cultura contendo o efluente. As placas foram incubadas a 28°C em estufa por 25 dias e foram observados os crescimentos dos fungos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 exibe o desenvolvimento de *Aspergillus oryzae* em placas de Petri, contendo os efluentes adicionados de 0, 5, 10, 15 e 20% (m/v) de sacarose, após 25 dias de inoculação. Não foi possível observar a formação de massa de fungos na placa, no entanto notou-se a presença de partes turvas em algumas placas, parecida com uma formação micelial modesta.

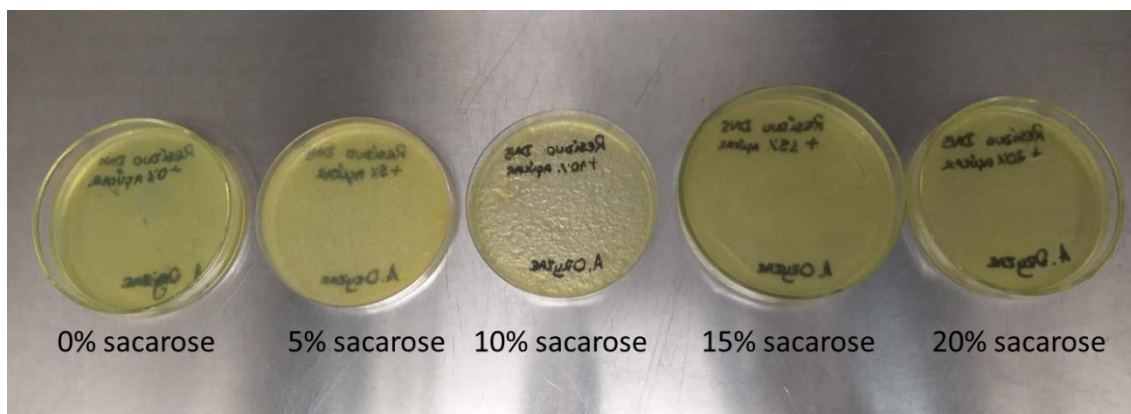


FIGURA 1. Placas de Petri contendo efluente sem adição e adicionado de 5, 10, 15 e 20% de sacarose, inoculadas com *A. oryzae* e incubadas a 28°C por 25 dias.

Foram coletadas, com *swab* estéril, amostras das áreas turvas das placas contendo *A. oryzae*, e as mesmas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar PDA. Após a incubação a 28°C por 5 dias foi notável o crescimento do fungo com as características miceliais de esporulação da linhagem em estudo. Desse modo, pode-se afirmar que o *Aspergillus oryzae* foi resistente ao efluente, no entanto não conseguiu se desenvolver tendo esse resíduo como meio de cultura.

A Figura 2 exibe o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* isolado ssc 03 em placas de Petri contendo os efluentes adicionados de 0, 5, 10, 15 e 20% (m/v) de sacarose. É possível observar o crescimento contínuo do fungo ao longo dos 25 dias de incubação. Observa-se também que o maior crescimento ocorreu no meio contendo 20% de sacarose. Uma parte da massa micelial que cresceu na placa de Petri contendo o efluente e 20% de sacarose foi transferida para ágar PDA e incubado nas mesmas condições descritas, sendo observado o crescimento satisfatório e característico do microrganismo.

Desta forma, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* mostrou-se resistente ao efluente em questão e capaz de nele se desenvolver, mesmo que em velocidade inferior ao observado em ágar PDA (recobrimento da placa de Petri em média em 5 dias), apresentando potencial de degradação do DNS e outros componentes do efluente.

A *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo de solo, causador de murcha e morte em varias espécies de planta, sendo muito conhecido por ser o agente etiológico do mofo branco. O microrganismo possui micélio hialino, septado e muito ramificado, e ao se desenvolver forma uma massa cotonosa na superfície do meio de crescimento. Este fungo em escassez de nutriente produz escleródios, os quais podem permanecer viáveis podendo germinar mesmo após alguns anos (KREICY, 2016).

Na sequência deste estudo, visando à aplicação do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* em processos fermentativos para degradação do efluente da análise de açúcares redutores por DNS, serão conduzidos ensaios em fermentação submersa sendo monitorados os teores de compostos fenólicos e absorvância das amostras nos comprimentos de onda característicos do DNS e do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

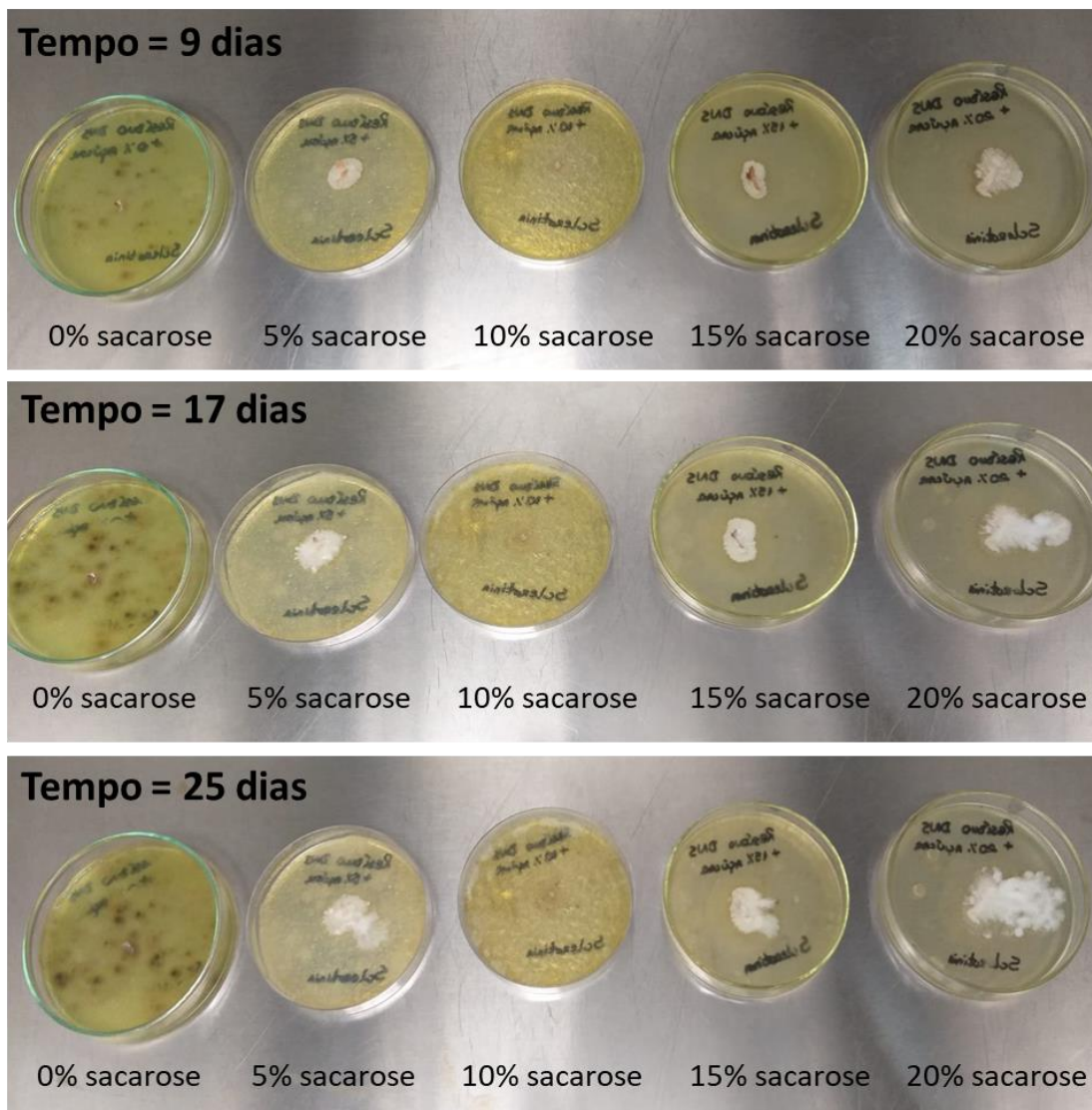


FIGURA 2. Fotos das placas de Petri, contendo efluente adicionado de diversas concentrações de sacarose, inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*.

CONCLUSÕES

Conclui-se que tanto o fungo *Aspergillus oryzae* quanto o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foram resistentes ao efluente da análise de açúcares redutores por DNS, entretanto o *A. oryzae* não apresentou crescimento considerável tendo o resíduo como meio de cultura, mostrando-se inviável para a biodegradação do efluente, enquanto a *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou crescimento considerável, sendo um microrganismo com potencial de biodegradação dos compostos em questão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Federal de Ciência, Tecnologia e Educação de São Paulo, Câmpus Avaré, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio estrutural e financeiro ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABIRAMI, B. Current approaches on the biodegradation of recalcitrant compounds from various industrial effluents. **Scientia Biologia Journal**, v.1, p. 22-28, 2013.

CHAUSSEONNERIE, S.; SAAIDI, P.; UGARTE, E.; BARBANCE, A.; FOSSEY, A.; BARBE, V.; GYAPAY, G.; BRÜLS, T.; CHEVALLIER, M.; COUTURAT, L.; FOUTEAU, S.; MUSELET, D.; PATEAU, E.; COHEN, G. N.; FONKNECHTEN, N.; WEISSENBACH, J.; PASLIER, D. Microbial degradation of a recalcitrant pesticide: chlordecone. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2016.

KREICY, P. F. *Sclerotinia sclerotiorum*: características morfológicas, agressividade, sensibilidade “*in vitro*” a fungicidas e resistência de isolados de tiofanato metílico. **Tese de Doutorado**, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba, 146p., 2016. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-06012017-095420/publico/Patricia_Fabretti_Kreyci_versao_revisada.pdf>. Acesso em: 28 de agosto de 2022.

MADAJ, R.; KALINOWSKA, H.; SOBIECKA, E. Nitroaromatic enzymatic biodegradation system in *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology and Food Science**, v. 82(2), p. 113-128, 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426-428, 1959.

PAGNO, V.; SALAPATA, A.; SCHMITZ, E. P. S.; CABRERA, L. C. Levantamento de resíduos de laboratórios, propostas de atividades experimentais e ações com foco em Química Verde. **ACTIO**, Curitiba, v. 2(2), p. 80-96, 2017.

SANTOS, V.L.; LINARD, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1001-1006, 2004.

ZHAO, L. WU, Q.; MA, A. **Biodegradation of phenolic contaminants: current status and perspectives**. 2017 International conference on advanced environmental engineering (ICAEE2017), v.111, 2018. Doi: 10.1088/1755-1315/111/1/012024.