

II-472 – ENSAIOS RESPIROMÉTRICOS PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS POR PELLETS FÚNGICOS

Andreza Maia Vidal do Nascimento⁽¹⁾

Graduando em Tecnologia em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Limoeiro do Norte).

Elivânia Vasconcelos Moraes dos Santos⁽²⁾

Graduação em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Fortaleza). Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Doutora em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Professora do Curso de Tecnologia em Saneamento Ambiental do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Limoeiro do Norte).

Heraldo Antunes Silva Filho⁽³⁾

Graduação em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Fortaleza). Mestre em Engenharia Civil e Ambiental pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Doutor em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Professor do Curso de Tecnologia em Saneamento Ambiental do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Limoeiro do Norte).

Jarbas Rodrigues Chaves⁽⁴⁾

Graduação em Saneamento Ambiental pelo Centro de Ensino Tecnológico (Centec). Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Fortaleza). Técnico de Laboratório do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Limoeiro do Norte).

Glória Maria Marinho Silva⁽⁵⁾

Graduação em Farmácia-bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Professora do Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-Fortaleza).

Endereço⁽¹⁾: Rua Estevam Remígio - CEP: 62930-000 - Brasil - Tel: (88) 3447-6413 - e-mail: andreza--maria@hotmail.com

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade metabólica do fungo *Aspergillus Niger* com diferentes substratos orgânicos (acetato, glicose e ácido acético). Para realização deste estudo os fungos foram crescidos em *pellets* e submetidos a testes respirométricos adicionando os substratos orgânicos e observando a taxa de consumo de oxigênio (TCO) no metabolismo de cada composto. Através dos resultados de TCO máxima, DQO oxidada e da constante de meia saturação foi possível afirmar que o fungo teve mais afinidade com ácido acético, embora determinando a constante de meia saturação para os três substratos os mesmos apresentaram valores baixos, indicando que o fungo é capaz de utiliza-los a velocidade máxima até esgotá-los.

PALAVRAS-CHAVE: *Aspergillus niger*, substrato orgânico, Respirometria, Taxa de consumo de oxigênio.

INTRODUÇÃO

O metabolismo dos microrganismos refere-se aos processos bioquímicos que envolvem a degradação de macromoléculas (catabolismo), tendo como resultado a produção de energia, e anabolismo onde há a conversão do material orgânico em um novo material celular.

Em princípio essas reações bioquímicas de mineralização de compostos e síntese celular resultam em fenômenos mensuráveis. A oxidação de material orgânico por microrganismos heterotróficos causa consumo de oxigênio dissolvido na água em que se realiza o metabolismo e este consumo pode ser determinado experimentalmente, portanto a taxa metabólica pode ser estimada através da medição da taxa de consumo de oxigênio.

A taxa de respiração ou taxa de consumo de oxigênio (TCO) é uma das poucas variáveis acessíveis que indica a atividade biológica (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999). Se o catabolismo é oxidativo, a massa de material orgânico catabolizada ou oxidada pode ser determinada pela massa de oxidante consumido, se tem por definição que 1 grama de OD consumido equivale a 1 grama de DQO oxidada (METCALF; EDDY, 2003).

Como o consumo de oxigênio é diretamente associado à remoção de substrato e ao crescimento da biomassa, a respirometria é uma técnica útil para a modelagem e operação de processos que envolvem o uso de microrganismos aeróbios no tratamento de águas residuárias (COKGOR et al., 2009).

Os ensaios respirométricos associados a modelos matemáticos são comumente realizados fazendo uso de substratos específicos que serão consumidos por grupos alvo, a exemplo de fonte de carbono para os grupos heterotróficos para determinação dos dados cinéticos e estequiométricos de comunidades biológicas em sistemas de lodo ativado.

A respirometria é uma técnica de grande importância na avaliação da afinidade de diferentes substratos com microrganismos heterotróficos, contudo, não é recorrente a aplicação com fungos no metabolismo oxidativo. Os fungos possuem a habilidade de se desenvolverem em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados, como os compostos recalcitrantes, utilizando-os como fonte de energia para crescimento e manutenção do seu metabolismo.

Apesar de recente, em comparação com outros sistemas biológicos, a utilização de fungos na biorremediação de poluentes de fácil e de difícil degradação tem sido relatada na literatura especializada devido ao potencial enzimático desses microrganismos (VAN LEEUWEN et al., 2012).

Entre os compostos orgânicos, a glicose tem sido usada extensivamente como substrato modelo na caracterização cinética de diferentes populações de microrganismos e no co-metabolismo dos fungos na degradação de compostos recalcitrantes como fenol, corantes e pesticidas (SANTAELLA et al. 2009; PAN et al. 2008; SAMPAIO, 2005).

Apesar do frequente uso principalmente da glicose, além da sacarose, frutose e outros compostos orgânicos desconhece-se sobre os substratos os quais são de maior afinidade com fungos. Entende-se como substrato de maior afinidade com os microrganismos aeróbios, os que exercem maior consumo de oxigênio, menor constante de meia saturação e elevadas taxas de TCO (GARCIA-OCHOA et al., 2010).

Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo avaliar o metabolismo de três diferentes substratos orgânicos a fim de caracterizar o de melhor afinidade com o fungo *Aspergillus Niger*, tendo-se como recurso o uso da respirometria.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Aspergillus niger* AN 400 como inóculo devido à comprovada capacidade da síntese de um grande número de metabólitos e de crescer em diferentes fontes de matéria orgânica, caracterizando-o como um microrganismo que pode ser utilizado no tratamento biológico de águas residuárias (FÉLIX, 2005).

CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO

Para obtenção do inóculo, os esporos do fungo *A. niger* foram crescidos em placas de Petri contendo 15 mL do meio sólido Agar batata dextrose e incubados a 28 °C. Após o tempo de incubação de 7 dias, com auxílio de alça de Drigalski, removiam-se os esporos com solução salina com Tween-80 0,1 % (v/v) formando uma suspensão, os quais eram transferidos e armazenados em frascos esterilizados.

Para determinar a concentração de esporos da suspensão foi usada uma alíquota diluída para uma razão de 1:50 e transferida para uma câmara de Neubauer de 0,1 mm³ até o completo preenchimento. Um microscópio óptico com aumento de 400x foi utilizado para a contagem microscópica.

PRODUÇÃO DOS PELLETS

O crescimento do fungo foi realizado utilizando um conjunto de erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de farinha de trigo a 20 g.L^{-1} e 1 mL da solução nutritiva de Vishniac. O meio de crescimento foi previamente esterilizado e teve o pH ajustado para 4,0 com H_2SO_4 1N antes da adição dos esporos na concentração de $2,0 \times 10^6$ esporos/mL. Em seguida os frascos foram fechados com algodão hidrófobo e submetidos à agitação orbital de 120 rpm durante 72 h a 30°C , para crescimento do micélio e peletização.

Decorrido o tempo de reação os *pellets* foram retirados e separados do substrato em peneira de 1 mm de malha, lavados com água destilada e secos para serem utilizados nos ensaios de respirometria. Nos ensaios os *pellets* foram imerso em meio ácido (solução tampão pH 4,0), obtendo o volume final de 1 L.

TESTES RESPIROMÉTRICOS COM SUBSTRATOS ORGÂNICOS

Os ensaios respirométricos seguiram o procedimento descrito por Catunda *et al.* (1996). Nos ensaios de respirometria utilizou-se o respirômetro Beluga S32c, do tipo aberto e com aeração fornecida de forma semicontínua.

Um aerador era ligado ao respirômetro que através do software do equipamento ativava o aerador quando as concentrações de OD atingia um limite inferior de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e desativava quando atingia o limite superior também estabelecido de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, tornando assim ciclos com aeração e sem aeração.

Os valores de referência foram escolhidos de acordo com a resposta metabólica do fungo, para que não houvesse erro na leitura da TCO. Durante os períodos sem aeração em que havia a diminuição de OD pela biomassa de fungos, o software calcula os valores da TCO a partir da diminuição linear da concentração de OD em função do tempo.

Os dados de TCO, OD e temperatura foram registrados automaticamente e arquivados em planilhas do Excel, sendo que a TCO e a concentração de OD podiam ser vistas graficamente na tela do monitor. A Figura 1a mostra o aparato instrumental e a Figura 1b um respirograma gerado durante os ensaios com o fungo.

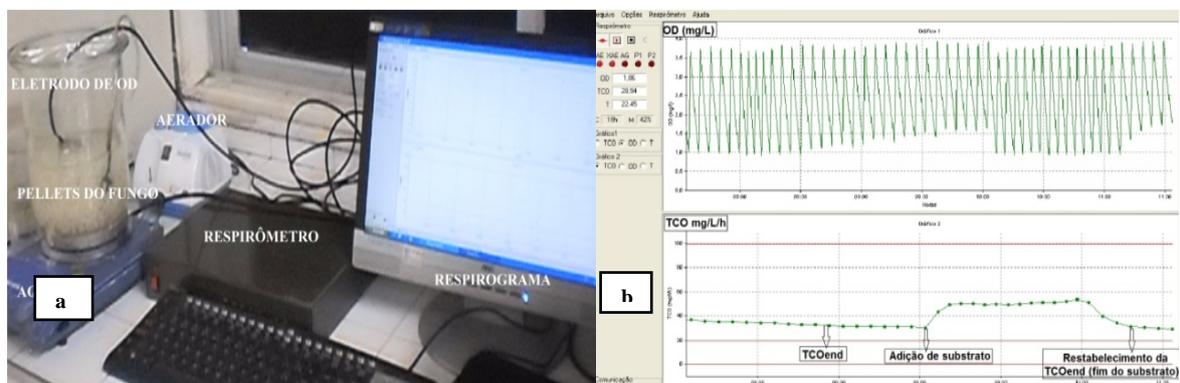


Figura 1: Equipamentos usados nos testes respirométrico (a) Respirograma gerado nos testes com fungo *A. niger* após adição de substrato (b).

SUBSTRATOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS RESPIROMÉTRICOS

Para realização dos testes respirométricos com *A. niger*, foram utilizados 03 (três) compostos orgânicos, simulando a matéria orgânica na forma de DQO: acetato de sódio, composto solúvel que é normalmente utilizado para testes com bactérias heterotróficas devido a sua comprovada facilidade de assimilação, glicose normalmente utilizada como substrato auxiliar na degradação de compostos recalcitrantes por fungos com amplo uso em processos fermentativos para a produção de ácidos orgânicos e por fim, ácido acético (Tabela 1).

Tabela 1: Substratos utilizados como fonte de carbono nos ensaios.

Substratos	Classificação	DQO teórica g DQO/g de substrato	Fórmula química
Acetato de sódio	Sal trihidratado	0,949	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Glicose	Monossacarídeo	1,066	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Ácido acético	Ácido carboxílico	1,066	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$

Foram realizados seis ensaios com cada substrato produzindo 18 respirogramas no total. Nos testes respirométricos, a mesma quantidade em termos de DQO era utilizada para os substratos (60 mg.L^{-1}), a partir de uma solução estoque preparada com concentração de DQO previamente conhecida (método titulométrico, Standard Methods 5220 C / APHA *et al.* 2012).

CRITÉRIOS PARA DEFINIÇÃO DO MELHOR SUBSTRATO PARA ENSAIOS COM O FUNGO *ASPERGILLUS NIGER*

Como se encontra ilustrado no respirograma abaixo (Figura 2), na definição do substrato de maior afinidade para cada composto orgânico testado foi determinado:

- A taxa máxima exercida de consumo de oxigênio (TCO máx.), esse valor foi verificado diretamente no respirograma gerado após adição dos compostos orgânicos ou nos dados armazenados;
- O maior consumo de oxigênio na respiração exógena, calculado a partir da área debaixo da curva, considerando que a área é composta por uma série de trapézios formados pelos valores de duas TCO's consecutivas;
- E a constante de meia saturação de Monod (1949), valor determinado no momento em que a TCO exógena se reduz em 50 % do seu valor máximo ($\text{TCO}_{\text{exo}}/2$), nesse instante a concentração do substrato é igual a constante de meia saturação (K_{ss}).

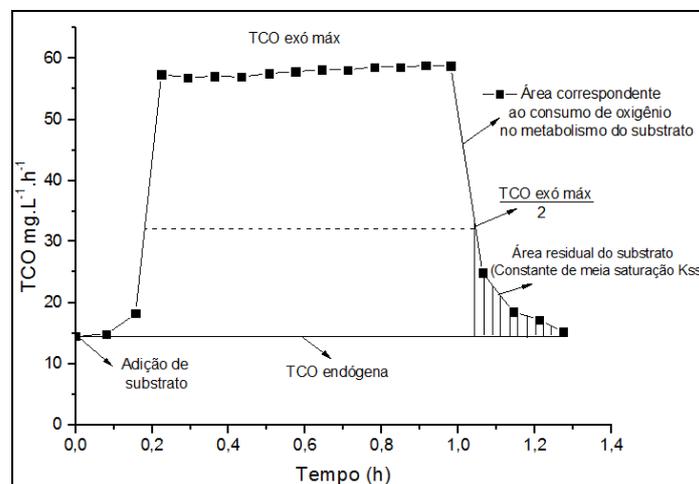


Figura 2: Respirograma produzido após adição de substrato para a determinação da TCO máx, respiração exógena e a constante de meia saturação.

RESULTADOS

CRESCIMENTO DO FUNGO

Como pode ser verificado na Figura 3, usando farinha de trigo como substrato, nessas condições de ensaio permitiu o crescimento fungo na forma de *pellets*, morfologia que se caracteriza por massas miceliais densamente entrelaçadas e compactas.

Essa morfologia é desejável em diversos processos biológicos, devido os *pellets* não alterar excessivamente a viscosidade do meio em comparação ao crescimento filamentososo do fungo, o que favorece a transferência de oxigênio, reduzindo o consumo de energia para aeração e agitação em biorreatores (KRULL *et al.*, 2013).



Figura 3: Morfologia apresentada pelo *Aspergillus niger* crescido em farinha de trigo no final de 72 h.

METABOLISMO OXIDATIVO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS

A Figura 4 mostra que repetindo a adição dos dois substratos (acetato e glicose) na mesma concentração na batelada de *pellets* observou-se em boa aproximação que as curvas de TCO também se repetiram, indicando uma boa confiabilidade dos ensaios.

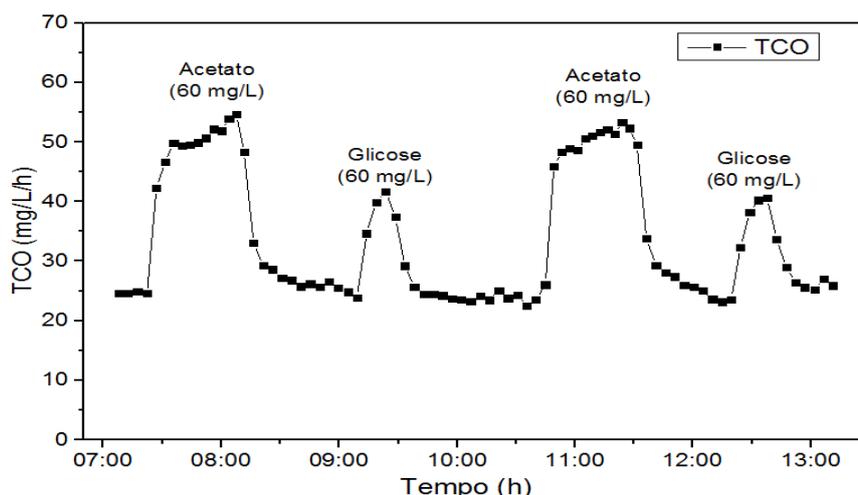


Figura 4: Perfil típico da TCO após adição de acetato e glicose aos *pellets* do fungo. Autor, 2016.

A área da curva compreendida entre a TCO endógena e a TCO exógena representa o consumo de oxigênio para a utilização do substrato. Esse consumo de oxigênio é equivalente à DQO do substrato consumido no catabolismo. Na avaliação da DQO oxidada, nos testes respirométricos utilizando os três substratos biodegradável e solúvel, os resultados demonstraram que o fungo *A. Niger* utilizou mais oxigênio para metabolizar o ácido acético, seguido pelo acetato e glicose.

Ilustrando um dos resultados para os três substratos (ácido acético, acetato e glicose) a fração de DQO oxidada de 60 mg.L⁻¹ adicionada foi respectivamente de 24,4 mg.L⁻¹, 20,0 mg.L⁻¹ e 5,3 mg.L⁻¹, conforme a Figura 5 .

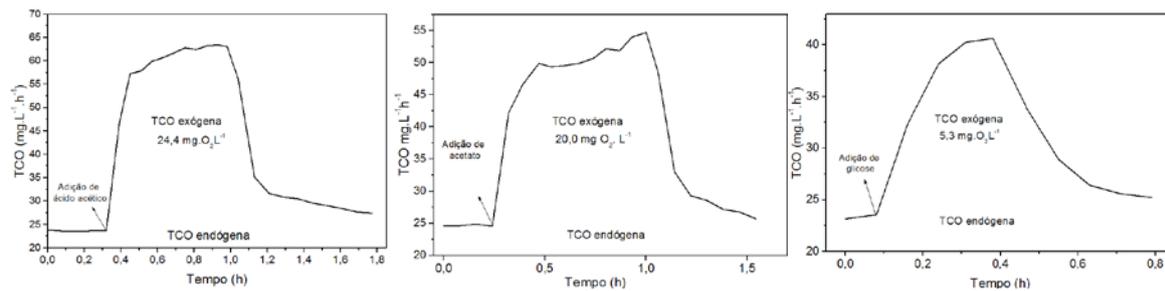


Figura 5: Metabolismo oxidativo pela batelada de *pellets* fúngicos dos três substratos orgânicos.

RECUPERAÇÃO DO COMPOSTO ORGÂNICO ADICIONADO

Nos ensaios com os compostos orgânicos foi verificada sempre uma boa recuperação para o substrato acetato de sódio com valor médio de 99,2 %. Essa recuperação foi determinada através do cálculo das áreas dos gráficos sabendo que 1/3 da DQO é oxidada e 2/3 são sintetizados (VAN HAANDEL; MARAIS, 1999).

No caso do uso do ácido acético a fração oxidada foi sempre maior do que 1/3 indicando uma maior facilidade de assimilação desse composto pelo fungo (128,1 %). A exceção foi o substrato glicose adicionado, em que não houve boa correspondência entre a demanda teórica de oxigênio (20 mg.L⁻¹) e a demanda observada experimentalmente apresentando o menor percentual médio de recuperação (22,3 %).

A Figura 6 mostra a possível rota metabólica de cada composto, em que se verifica a maior oxidação dos compostos, ácido acético e acetato, com respectivos percentuais destinados ao catabolismo de 46 % e 33 %. A glicose sempre exerceu um menor consumo de oxigênio evidenciando uma menor parcela de DQO oxidada (7,6 %). Contudo, nos testes não é possível afirmar se a maior fração que não foi oxidada (92,4 %) seguiu completamente para a rota anabólica ou se alguma parcela ficou inalterada no meio.

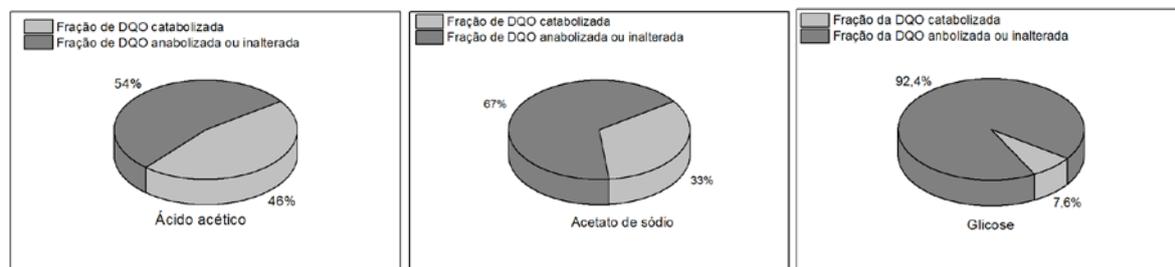


Figura 6: Fração de matéria orgânica destinada ao metabolismo oxidativo e anabolizada e/ou inalterada

DETERMINAÇÃO DA TCO MÁXIMA E DA CONSTANTE DE MEIA SATURAÇÃO (K_{ss})

A Tabela 2 refere-se aos dados médios de TCO máxima, TCO exógena e a constante de meia saturação de cada substrato. Em relação às TCOs máximas o substrato ácido acético apresentou maior valor (59,5 mg.L.h⁻¹), seguido por acetato (54,8 mg.L.h⁻¹) e glicose (46,2 mg.L.h⁻¹). Os resultados apoiam os dados da literatura em que os substratos de maior afinidade com o microrganismo exercem maior TCO, como ocorre com o ácido acético, com maior valor da TCO exógena referente ao metabolismo oxidativo (31,6 mg.L.h⁻¹).

Para os substratos utilizados na concentração de 60 mg.L⁻¹ com a batelada de *pellets* de fungos a constante de meia saturação variou de acordo com o substrato, o valor médio de K_{ss} para o ácido acético foi de 2,2 mg.L⁻¹, para o acetato foi de 2,8 e para a glicose ligeiramente maior (5,4 mg.L⁻¹). Os valores baixos de K_{ss} na utilização de material orgânico totalmente solúvel como acetato, glicose e ácido acético ocorrem à velocidade máxima praticamente até esgotar o substrato.

Tabela 2: Dados médios referentes à TCO máxima, TCO exógena e a constante de meia saturação (K_{ss}), para os diferentes compostos orgânicos. Autor, 2016.

Substrato	TCO máxima (mg.L.h ⁻¹)	TCO exógena (mg.L.h ⁻¹)	Constante de meia saturação (K _{ss})
Ácido acético	59,5	31,6	2,2
Acetato	54,8	25,6	2,8
Glicose	46,2	16,3	5,4

CONCLUSÕES

Através dos resultados pode-se afirmar que a respirometria se mostra uma ferramenta importante para avaliar a afinidade de microrganismos aeróbios com diferentes substratos. Utilizando a taxa de consumo de oxigênio (TCO), foi possível determinar que o fungo *A. Niger* tem o metabolismo diferente dependendo do composto orgânico assimilado.

Os substratos usados nos testes causaram consumo de oxigênio no meio líquido, demonstrando que o fungo é capaz de utilizar ácido acético, glicose e acetato. A taxa de utilização do material orgânico pelos *pellets* fúngico mostrou que o substrato ácido acético foi o composto mais utilizado no processo metabólico com maiores valores de TCO.

A constante de meia saturação também variou de acordo com o substrato, apresentando baixos valores indicando que o fungo assimila todos os compostos estudados a toda velocidade. Quanto menor o valor de K_{ss} maior é afinidade do microrganismo com um dado substrato e maior é a taxa de crescimento, seguindo essa lógica, o ácido acético entre os substratos testados apresentou o menor K_{ss} e a maior TCO, apoiando o seu uso como co-substrato para crescimento do fungo *Aspergillus Niger* na degradação de compostos recalcitrantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 ed. Washington: American Public Health Association. 2012.
2. COKGOR, E. U. INSEL, G.; AYDIN, E.; ORHON, D. (2009) Respirometric evaluation of a mixture of organic chemicals with different biodegradation kinetics. *Journal of Hazard Mate*, v.161, n.15, p.35-41.
3. GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V.E.; MERCHUK, J.C. (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, n. 3, p. 289-307.
4. KRULL, R.; WUCHERPFENNIG, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R.; MELZER, G.; HEMPEL, D. C.; KAMPEN, I.; KWADE, A.; WITTMANN, C. (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v.163, p.112-123.
5. METCALF; EDDY. Inc. (2003) *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4. ed. McGraw Hill, p.1819.
6. MONOD, J. (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Annual. Review of Microbiology*, v.3, p.371-394.
7. PANT, D.; SINGH, A.; SATYAWALI, Y.; GUPTA, R. K.(2008) Effect of carbon and nitrogen source amendment on synthetic dyes decolourizing efficiency of white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Biology*, v.29, n.1, p.79-84.
8. SAMPAIO, G. M. M. S. *Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos*. 2005. 113f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
9. SANTAELLA, S. T.; JÚNIOR, F. C. G. S.; GADELHA, D. A. C. (2009) Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. *Engenharia Sanitária e Ambiental*,v.14, n. 1, p.139-148.
10. VAN HAANDEL, A; MARAIS, G. *O comportamento dos sistemas de lodos ativados: Teoria e aplicações para projetos e operações*. 1 ed. Campina Grande. 1999.
11. VAN LEEUWEN, J. H.; RASMUSSEN, M. L.; SANKARAN, S.; KOZA, C. R.; ERICKSON, D. T.; MITRA, D.; JIN, B. Fungal treatment of crop processing wastewaters with value-added co-products. *Sustainable Bioenergy and Bioproducts*, p.13-44, 2012.