

Eixo Temático ET-06-009 - Recuperação de Áreas Degradadas

**INTEGRAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE ENZIMA E BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE LOCAIS IMPACTADOS**

Maria da Glória Conceição da Silva<sup>1</sup> & Darne Germano de Almeida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Pernambuco, CNPq, gloriawerneck@hotmail.com; <sup>2</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Ponto focal de Pernambuco, FACEPE, e-mail: darnebio@yahoo.com.br

**RESUMO**

Acidentes em torno da cadeia produtiva do petróleo são apontados pela literatura como importantes fontes poluidoras. Diante dessa realidade, torna-se necessário desenvolver tecnologias para conter os possíveis impactos gerados. O óleo Diesel, um derivado do petróleo, é constituído por uma complexa mistura de alcanos e compostos aromáticos, sendo frequentemente relatado como contaminante do solo por vazamentos em tanques de armazenagem e gasodutos ou por derrames acidentais. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a capacidade de um fungo filamentosos, isolado de solo do Rio Beberibe, Recife-PE, em utilizar óleo Diesel como fonte de carbono para produção da enzima lignina peroxidase. Para este fim, foi aplicado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionado, cujas variáveis avaliadas para compor as condições de cultivo do micro-organismo foram: concentração de ferro, concentração de glicose, concentração de inóculo e concentração de óleo Diesel. Como resultado, a variável 'glicose' foi o único fator que influenciou estatisticamente na produção da enzima em estudo, embora o óleo Diesel também tenha servido como fonte de carbono e como substrato indutor. Estes resultados são indicativos do uso potencial deste micro-organismo e da enzima lignina peroxidase para compor novas tecnologias para tratamentos de resíduos recalcitrantes, tais como o óleo Diesel.

**Palavras-chave:** Biorremediação; Fungos filamentosos; Lignina peroxidase (LiP).

**INTRODUÇÃO**

O óleo Diesel é o derivado do petróleo mais utilizado no mundo, frequentemente relatado como contaminante do solo por vazamentos em tanques de armazenagem e gasodutos ou por derrames acidentais (READMAN et al., 2002; ADAM; DUNCAN, 1999). Em casos de contaminação ambiental, são utilizadas diversas estratégias de tratamento, sendo a biorremediação uma das alternativas que se destaca em virtude do reduzido impacto ao meio ambiente, devido ao uso de micro-organismos com capacidade metabólica de transformar ou degradar estes compostos. A enzima lignina peroxidase, usualmente isolada de fungos filamentosos de degradação branca ou parda, pode ser aplicada em bioprocessos para a biodegradação de hidrocarbonetos ou resíduos relacionados à estrutura química da lignina (MACIEL et al., 2010; DURÁN; ESPOSITO, 1997).

**OBJETIVO**

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de um fungo filamentosos, isolado de solo da margem do Rio Beberibe, Recife-PE, em utilizar

óleo Diesel como fonte de carbono para produção da enzima lignina peroxidase, a fim de verificar seu potencial na aplicação de tecnologias de biorremediação de locais impactados.

## METODOLOGIA

Foi utilizado um fungo filamentososo isolado do solo da margem do Rio Beberibe, Recife-PE. Este micro-organismo, nomeado por FDG8, encontra-se mantido em meio extrato de malte Agar (MEA) na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, o qual se encontra em fase de identificação.

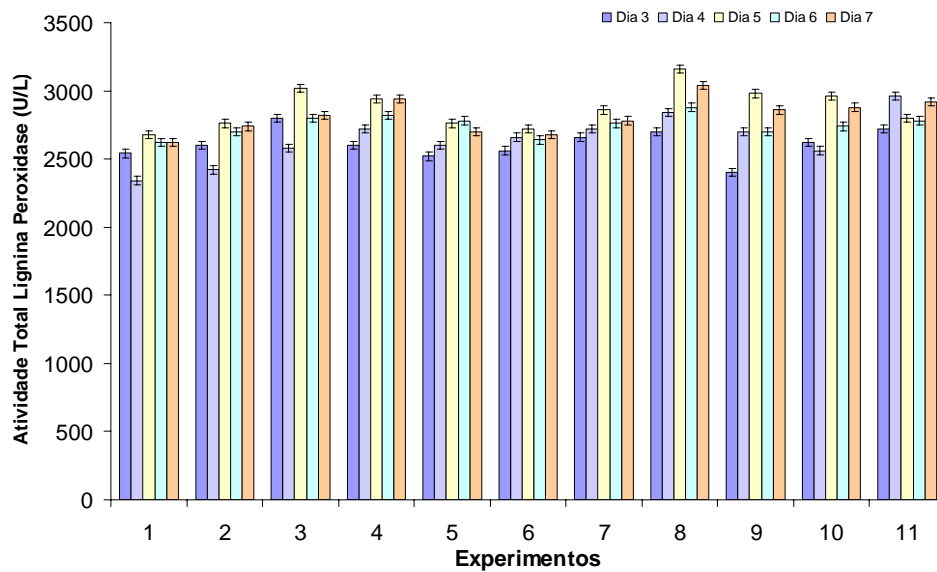
Para avaliar a capacidade do fungo FDG8 de produzir a enzima lignina peroxidase utilizando o óleo diesel como substrato, foi aplicado um Planejamento Experimental Fatorial Fracionado ( $2^{4-1}$ ) com dois níveis -1 e +1, e três repetições nos pontos centrais gerando onze condições experimentais, obtidas pelo software Statistica 6.0, cujas variáveis analisadas foram: concentração de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), concentração de óleo Diesel, concentração de glicose, e quantidade de inóculo fúngico como variáveis independentes e produção da enzima Lignina Peroxidase como variável resposta (Tabela 1). Todos os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mineral de Bushnell Hass com as concentrações e condições estabelecidas de acordo com o planejamento experimental e incubados durante 7 dias a 30 °C em condição estática. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software Statistica 6.0.

**Tabela 1.** Matriz experimental do Planejamento Fatorial Fracionado ( $2^{4-1}$ ).

Experimentos	$\text{FeCl}_3$ (g)	Glicose (g)	Inoculo ( $\square$ 0,6mm)	Diesel (ml)
1	0	0	1	1
2	0,01	0	1	5
3	0	0,5	1	5
4	0,01	0,5	1	1
5	0	0	5	5
6	0,01	0	5	1
7	0	0,5	5	1
8	0,01	0,5	5	5
9 (C)	0,005	0,25	3	3
10 (C)	0,005	0,25	3	3
11 (C)	0,005	0,25	3	3

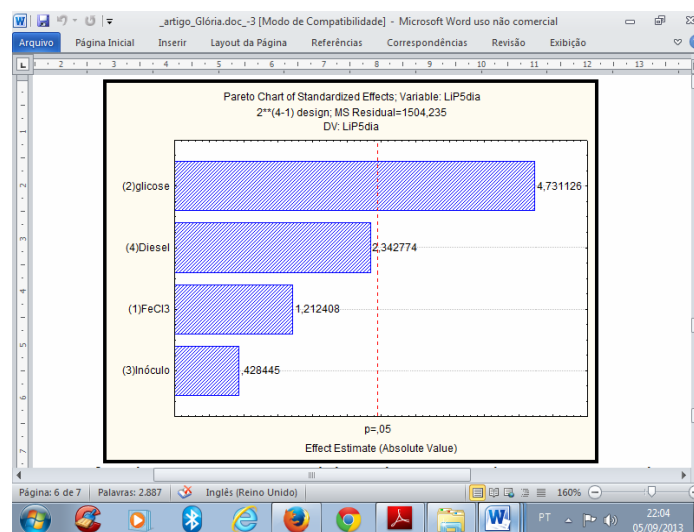
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental revelou que nos experimentos *oito* e *nove* ocorreu a maior produção de lignina peroxidase: 3042U/L – sétimo dia e 2997U/L – quinto dia, respectivamente (figura 2). Como não houve diferença estatística entre os resultados obtidos no experimento oito e nove ( $p = 0,46570$ ), ambas as condições são favoráveis para a produção de lignina peroxidase. Analisando-se então a efetividade do processo, as condições do experimento nove são mais indicadas, pois os constituintes do meio de cultivo, tais como  $\text{FeCl}_3$  e glicose, estão reduzidos à metade, bem como utiliza-se menos inóculo e óleo Diesel (Tabela 1). Estas características associadas à somente 5 dias de processo constituiriam vantagens para um processo de produção em larga escala.



**Figura 1.** Atividade total da enzima Lignina Peroxidase produzida pelo fungo FDG8 nos onze experimentos estabelecidos pelo planejamento experimental do terceiro ao sétimo dia de processo.

Na Figura 2 pode-se observar que a glicose foi, dentre todas, a única variável que influenciou estatisticamente no processo de síntese enzimática, ao passo que as outras não foram estatisticamente significativas, embora o óleo Diesel também tenha servido como fonte de carbono e como substrato indutor. Os hidrocarbonetos podem servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de micro-organismos. No entanto há a necessidade de outros nutrientes, como glicose, nitrogênio e o fósforo e micronutrientes (ROSATO, 1997). Maciel et al. (2010), trabalhando com fungos filamentosos isolados de local impactado por petroderivados, obtiveram uma atividade máxima para a LiP de 144 U/L, utilizando óleo diesel como substrato indutor. Também neste trabalho, obteve-se atividades enzimáticas máximas em um período de apenas 5 dias de incubação utilizando óleo Diesel com substrato.



**Figura 2.** Diagrama de Pareto, cuja variável dependente é a produção enzimática de Lignina Peroxidase.

## CONCLUSÕES

O fungo FDG 8, isolado do solo do Rio Beberibe, apresentou potencial biotecnológico para a produção da enzima lignina peroxidase utilizando óleo Diesel como substrato indutor. Com o planejamento fatorial, foi possível determinar que a adição de glicose ao processo promoveu uma otimização na produção da enzima por este fungo, enquanto que o ferro e a variação nas concentrações do inóculo ou do óleo Diesel não influenciaram estatisticamente no processo, embora este último também tenha servido como fonte de carbono e como substrato indutor. O fungo FDG 8 se mostrou promissor para a produção de Lignina peroxidase utilizando o óleo diesel como substrato e é indicado para a produção desta enzima em larga escala, bem como a estudos posteriores, a fim de se caracterizar melhor sua versatilidade metabólica e sua aplicabilidade em tecnologias de biorremediação de locais impactados com óleo Diesel.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, G., DUNCAN, H.J. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. **Environ Geochem Hlth.**, v. 21, p. 353-357. 1999.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. Documentos. 11:269-292, 1997.
- MACIEL, CCS, SOUZA, C.S., SILVA, R. VILLELA, A.L.S., SOUSA, M.F.V.Q., GUSMÃO, N.B. Degradação de querosene de aviação por *Penicillium* spp. **Diálogos em Ciência**, v. 8, n. 23, p. 69-75, 2010.
- READMAN, J.W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J.P.; CATINNI, C.; LEE, L.D. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 48-62, 2002.
- ROSATO, Y.B. Biodegradação do petróleo. *apud* MELO I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 14:307-334, 1997.