



AVALIAÇÃO INICIAL DO POTENCIAL DE *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué. NA BIORREMEDIAÇÃO DE VINHAÇA

INITIAL AVALIATION OF THE POTENTIAL OF *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué. IN BIORREMIATION VINASSE

Loreyne Maraya da Silva ⁽¹⁾
Alba Estephane da Silva ⁽¹⁾
Mayume Thaís de Oliveira ⁽¹⁾

¹ Curso de Ciências Biológicas Faculdade Integrado de Campo Mourão.

Marcela Funaki dos Reis ^{(2)*}

² Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UniCesumar, Centro Universitário de Maringá, Maringá, PR.

Endereço para correspondência: Centro Universitário de Maringá, Av. Guedner, 1610, Jd. Aclimação, Maringá - PR. CEP: 87050-900. Tel. (44) 3027-6360. e-mail: marcela.reis@unicesumar.edu.br

RESUMO

A vinhaça é um resíduo com origem na manufatura sucroalcooleira, sendo sua produção crescente no Brasil. Devido a toxicidade, coloração e turbidez a vinhaça pode promover danos a corpos de água. Nesse sentido, a biorremediação é uma alternativa viável. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a descoloração da vinhaça e o crescimento do fungo *Pleurotus eryngii*. Foram analisados os parâmetros de crescimento da colônia, biomassa do fungo e a descoloração promovida na vinhaça. Os resultados sugerem que *Pleurotus eryngii* é capaz de crescimento utilizando a vinhaça como substrato e que conforme ocorre aumento da concentração deste resíduo, diminui o crescimento do fungo, indicando tolerância a toxicidade. O fungo foi capaz de promover a descoloração da vinhaça indicando a degradação de compostos tóxicos. É possível sugerir que *P. eryngii* tem potencial de biorremediação da vinhaça.

Palavras-Chave: toxicidade; biomassa; basidiomiceto.

ABSTRACT

Vinasse is the waste produced in the manufacture of ethanol and sugar, and its production has increased in Brazil. Because its toxicity, color and turbidity, vinasse may contaminate water bodies, whereas bioremediation may be a viable alternative to the issue. Current paper analyzes the de-coloring of vinasse and the growth of the fungus *Pleurotus eryngii*. Colony growth, fungus biomass and de-coloration caused by vinasse are discussed. Results suggest that *Pleurotus eryngii* grows by taking vinasse as its substrate. Since increase in the concentration of the residue occurs, fungus growth decreases and reveals tolerance to toxicity. The fungus causes de-coloration of vinasse and shows the degradation of toxic compounds. It may be suggested that *P. eryngii* is capable of bioremediation to vinasse.

Key Words: toxicity; biomass; basidiomycete.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar destinada à produção de etanol e açúcar (1). Durante a manufatura destes produtos, na etapa de destilação, um subproduto residual é formado, a vinhaça.

Dependendo do processo de destilação, a proporção de vinhaça produzida por litros de etanol pode variar entre 10-14 litros (2). Considerando a produção de etanol total da safra 2013/2014 (3), foram gerados um volume de cerca de 385,602 mil/m³ deste resíduo. A vinhaça apresenta elevada toxicidade devido a riqueza em matéria

orgânica com elevada demanda biológica de oxigênio (DBO), pH ácido com consequente potencial de corrosividade (4,5).

A vinhaça lançada, na sua forma bruta, em cursos de água, pode conduzir a uma série de problemas ambientais por conta desta toxicidade, mas também pela coloração escura e turbidez (6). Levando em consideração o potencial de degradação ambiental da vinhaça, a Portaria do Ministério do Interior nº 323 proíbe o lançamento direto ou indireto deste resíduo em qualquer coleção hídrica pelas destilarias de etanol e açúcar (7).

Considerando os problemas ambientais que a vinhaça pode promover, uma das alternativas de manejo sustentável e economicamente viável é a sua utilização como biofertilizante da própria cultura da cana-de-açúcar. Outra alternativa a ser considerada é que após a concentração por evaporação, pode-se utilizar como meio de produção de energia para autoconsumo pela usina geradora (5-6,8). Contudo, um estudo recente de Pedro-Escher, Maziviero e Fontanetti (9) mostrou um lado preocupante da prática de uso da vinhaça em fertilização dos solos, uma vez que seu uso excessivo demonstrou toxicidade sobre o sistema-teste da *Tradescantia pallida* indicando mutagenicidade.

Nesse sentido a biorremediação da vinhaça pode se tornar uma ferramenta útil no tratamento deste resíduo (10). A biorremediação consiste em utilizar organismos vivos para tratar e diminuir a toxicidade de poluentes recalcitrantes sobre o ambiente (11). Para tanto os caminhos atuais da biotecnologia indicam os fungos basidiomicetos como eficientes na degradação de ampla variedade de compostos com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (12). Estes fungos, principalmente os cogumelos do gênero *Pleurotus* crescem em substratos nutricionalmente pobres e apresentam bom desenvolvimento em condições menos climatizadas (13-14). Seguindo esta proposta, estudos voltados para a biorremediação da vinhaça são

escassos e o emprego de fungos basidiomicetos apresenta grande potencial nesta área. Assim, este estudo tem como objetivo analisar o potencial de descoloração da vinhaça e o crescimento do fungo basidiomiceto *Pleurotus eryngii* sobre este substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinhaça

A amostra de vinhaça foi doada pela Usina Sabarálcool S/A Açúcar e Alcool, localizada na cidade de Engenheiro Beltrão – PR, durante a safra 2013. Este resíduo foi recolhido em galão, acondicionado em caixa térmica e encaminhado para Faculdade Integrado de Campo Mourão, Campo Mourão - PR, onde foi mantido em refrigeração. Para sua utilização o pH foi aferido (5,2) e mantido neste valor para as análises posteriores.

Fungo

Foi utilizada a linhagem comercial de *P. eryngii*, adquirida no Mercado Municipal de São Paulo - SP. A matriz foi mantida em meio de cultura Batata Ágar Dextrose – BDA (15) no laboratório de Microbiologia da Faculdade Integrado de Campo Mourão. A confirmação da espécie foi realizada por meio de análises das características morfológicas (16 -18). *P. eryngii* (Figura 1) geralmente apresenta basidioma crescendo sobre o substrato de forma isolada ou agregada. O píleo com 3-10 cm de diâmetro, hemisférico com himênio decorrente e cor de cutícula marrom claro levemente acinzentado. O estipe tem cerca de 2-9 X 0,5-2 cm, central a excêntrico, cilíndrico e caracteristicamente bulboso próximo a inserção ao substrato. Basídio com 4 basidióporos cilíndricos a elipsoides, hialinos, e quelocistídeos claviformes (4-5 x 8-10 µm).

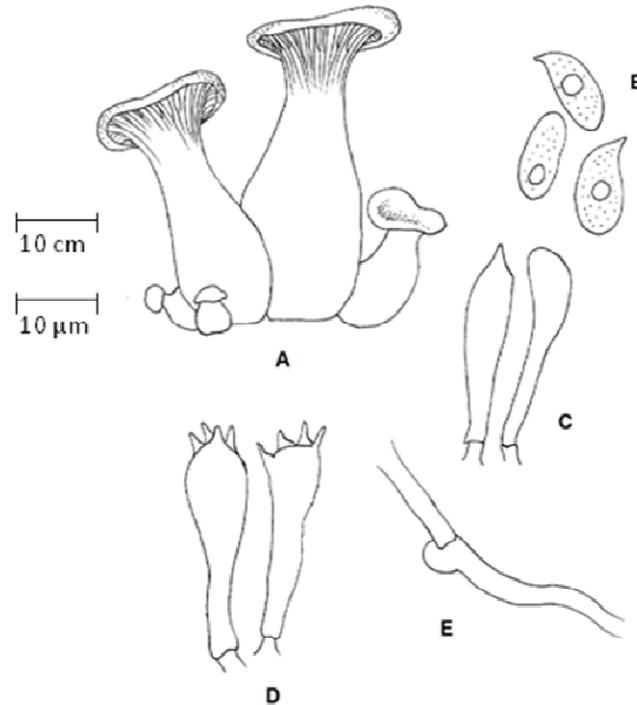


Figura 1. *Pleurotus eryngii*. A: Basidioma de *P. eryngii*, B: Basidiósporos, C: queilocistídeos, D: Basídio, E: micélio com grampo de conexão. A:

Inóculo

Previamente foi preparada a cultura do micélio de *P. eryngii* para obtenção do inóculo por cultivo em meio BDA durante 7 dias (15). Foram utilizados discos de 10 mm do micélio extraídos das bordas das colônias de *P. eryngii*.

Descoloração da vinhaça

Foi utilizada metodologia descrita por Ferreira (19) com modificações. Para avaliar a descoloração da vinhaça por *P. eryngii* o pH inicial de 5,2 foi mantido e partir deste foram realizadas diluições (9,18 e 30%) em meio de cultura. O controle foi constituído apenas do meio de cultura BDA. A vinhaça foi colocada em frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade com 100 mL de tratamento e a inoculação realizada com 2 discos de micélio de *P. eryngii*. As culturas foram mantidas em estufa a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 dias. A porcentagem de descoloração da vinhaça na cultura foi determinada segundo metodologia sugerida por

Sirianuntaiboom et al. (20). Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 475 nm contra um branco. Para calcular a porcentagem de descoloração foi utilizada a seguinte fórmula:

$$A_{\text{cultura}} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{cultura}} \times 100}{A_{\text{controle}}} \quad (1)$$

onde, A_{cultura} é a absorbância a 475 nm do sobrenadante da cultura dos tratamentos com vinhaça e A_{controle} é a absorbância a 475 nm do sobrenadante do controle. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de descoloração da vinhaça.

Biomassa

A análise da biomassa de *P. eryngii* foi realizada por meio da separação do micélio ao final do cultivo de análise da descoloração. O micélio foi pesado para o estabelecimento do peso úmido. Em seguida

colocado para secagem em estufa a 45°C até peso constante. O valor de biomassa foi dado pela diferença entre o peso úmido e o peso após secagem em estufa.

Desenvolvimento da colônia de *P. eryngii*

O desenvolvimento da colônia de *P. eryngii* foi analisado por meio do cultivo em estado sólido em placa de Petri. Foram realizadas diluições da vinhaça em meio BDA nas concentrações de 9, 18 e 30%. A inoculação foi procedida pela aplicação de 1 disco de micélio de *P. eryngii* no centro da placa de Petri contendo uma das concentrações da vinhaça testadas. As culturas foram mantidas em estufa a 28 °C ± 5 °C durante 10 dias. O crescimento radial da colônia de *P. eryngii* foi aferido diariamente por meio da análise do diâmetro da colônia em duas direções perpendiculares e expresso como cm da colônia/dia.

Análise Estatística

Foram utilizadas 3 repetições entre tratamentos e controles, sendo cada Erlenmeyer e placa de Petri considerados uma unidade experimental. Os resultados foram expressos como média e desvio

padrão e comparados pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado o potencial de descoloração da vinhaça e de crescimento de *P. eryngii* em vinhaça. Para tanto, foram analisados a porcentagem de descoloração, produção de biomassa e desenvolvimento da colônia, em diferentes concentrações de vinhaça.

Com relação a descoloração da vinhaça promovida por *P. eryngii* (Tabela 1) as concentrações de 9% e 18% contribuem com a remoção da cor deste resíduo (Figura 2), sendo a maior concentração a significativa ($p > 0,05$). Também é possível afirmar que concentrações superiores a 18% da vinhaça podem inibir o crescimento deste fungo em meio líquido provavelmente devido a sua toxicidade. Os resultados encontrados no presente estudo são comparáveis aos de Neves et al. (21) que analisaram o potencial de descoloração do corante amarelo crepúsculo. Porém, são inferiores aos encontrados por Ferreira et al. (19), que verificaram a descoloração da vinhaça por *P. sajor-caju*.

Tabela 1. Porcentagem de descoloração de vinhaça e peso seco do micélio de *P. eryngii*

Tratamento	Descoloração (%)	Biomassa Seca (g)
CO	92,97 ± 0,00 ^c	0,78 ± 0,59 ^c
9 %	76,71 ± 0,08 ^b	0,45 ± 0,32 ^a
18%	58,16 ± 0,96 ^a	0,34 ± 0,03 ^a
30%	Nd	Nd

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b,c} valores significativos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Nd: não apresentou desenvolvimento micelial.



Figura 2. Remoção da cor da vinhaça por *P. eryngii*. A: após a inoculação dos discos de micélio. B: Após cultivo com *P. eryngii*.

O estudo de Vive e Rizk (22) analisou o potencial de descoloração da vinhaça com o sistema de tratamento H_2O_2/UV , mas este sistema apresentou percentual de remoção da cor inferior quando comparado com o presente estudo, com só 20% de descoloração. Já Souza et al. (23) utilizaram os sistemas de fotólise e fotocatalise para descoloração da vinhaça e estes sistemas promoveram uma descoloração de apenas 28% e 45%, respectivamente. Isto mostra a eficiência nos sistema de biorremediação em comparação com métodos químico-físicos de remoção da cor.

Trabalhos que mostram o potencial de descoloração de compostos utilizando fungos basidiomicetos são amplamente utilizados para identificar o potencial de degradação de compostos recalcitrantes. Ferreira et al. (19) sugerem que a biorremediação utilizando espécies de *Pleurotus* permite, além da descoloração da vinhaça, a degradação de compostos complexos, com redução da toxicidade e melhora nas suas propriedades físico-químicas. Embora neste estudo não tenham sido realizadas tais análises é possível propor que a descoloração da vinhaça promovida por *P. eryngii* auxilie na degradação dos compostos recalcitrantes presentes na vinhaça. Isto pôde ser

confirmado por Machado et al. (24) que considera que estes fungos são capazes não só de descolorir um resíduo, mas também de degradar e mineralizar um amplo espectro de corantes, além de inúmeros compostos de caráter tóxico e recalcitrante. Nesse sentido, os resultados do estudo são promissores, como aponta Aragão et al. (25) que verificaram que conforme ocorre aumento da descoloração do efluente, concomitantemente ocorre a diminuição da toxicidade.

Quando relacionadas a produção de biomassa e a porcentagem de descoloração da vinhaça é possível reconhecer que a concentração de 18% de vinhaça é limítrofe para a biorremediação deste resíduo por *P. eryngii*, uma vez que não existem diferenças significativas entre este parâmetro analisado ($p>0.05$). Os resultados para biomassa, embora sem diferenças significativas entre as concentrações testadas, são superiores aos de Aguiar-Filho (26) que analisou a biomassa de *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju* e *ostreatoroseus* em bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com vinhaça.

O perfil do desenvolvimento da colônia de *P. eryngii* mostrou que nas concentrações de vinhaça testadas houve inibição do crescimento do fungo (Figura 3).

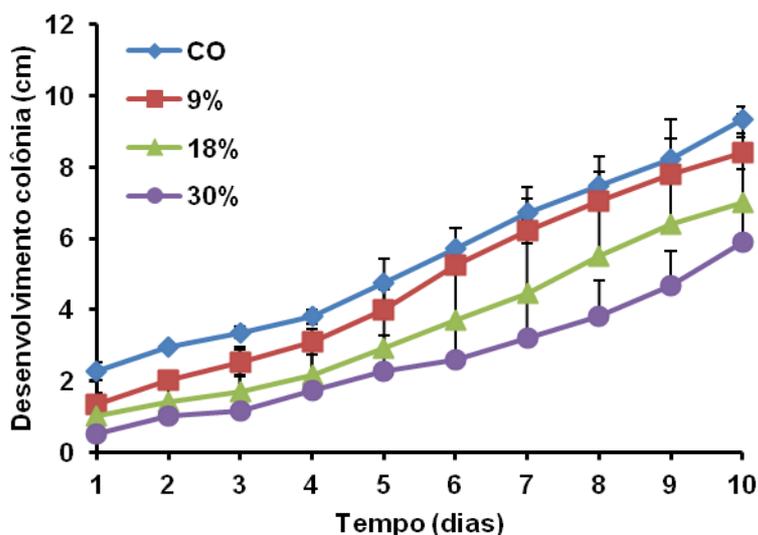


Figura 3. Desenvolvimento da colônia de *P. eryngii*. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

É possível observar que é proporcional o aumento na concentração da vinhaça e a diminuição do crescimento do fungo, e neste caso a concentração de 9% deste resíduo é significativamente igual ao controle ($p > 0,05$). No entanto, no caso das concentrações de 18 e 30% estas são significativamente iguais entre si, mas diferentes do controle ($p > 0,05$). Nestas concentrações é possível observar a inibição do crescimento de *P. eryngii*, tornando o desenvolvimento micelial possível, embora lento, indicando tolerância a potencial toxicidade da vinhaça. Resultado semelhante foi observado por Cordeiro (27), que analisou a eficiência da degradação do efluente Kraft por *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus florida*, confirmando que a inibição do crescimento micelial é um indicativo da presença de compostos tóxicos no substrato.

As espécies do gênero *Pleurotus* são conhecidas como hábeis colonizadoras de diferentes substratos de cultivo apresentando o micélio com crescimento rápido e vigoroso (28), assim, apesar da inibição de

crescimento micelial é possível afirmar que *P. eryngii* tolera o crescimento sobre a vinhaça utilizando este resíduo como substrato.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do desenvolvimento da colônia de *P. eryngii* utilizando a vinhaça como substrato permite concluir que este fungo tolera o crescimento sobre este resíduo, sendo a concentração de 18% o limítrofe. E pode-se afirmar que *P. eryngii* é capaz de aplicabilidade para remoção da cor da vinhaça. Sugere-se que em estudos futuros seja analisado o potencial de degradação de compostos tóxicos presentes na vinhaça seguida de testes toxicológicos *in vivo* após a biorremediação utilizando este fungo. Assim, os resultados indicam uma possível e promissora aplicação de *P. eryngii* na biorremediação da vinhaça.

REFERÊNCIAS

- (1) COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento.** Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, 2013, 18p.
- (2) LAMO, P. **Sistema Produtor de Gás Metano Através de Tratamento de Efluentes Industriais - METHAX/BIOPAQ - CODISTIL -** Piracicaba, 1991.
- (3) UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇUCAR. **Histórico de produção e moagem de etanol total safra 2013/2014.** Disponível em:<<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 05 de dez. 2014.
- (4) SANTOS, T.M.C. et al. Fertirrigação com vinhaça e seus efeitos sobre evolução e liberação de CO₂ no solo. **Revista Caatinga**, v. 22, n.1, p.141-145, 2009.
- (5) PIRES, R.A.P. **Utilização da vinhaça na bio-fertirrigação da cultura da cana-de-açúcar: estudo de caso em Goiás.** 2008. 22f (Monografia). Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2008.
- (6) BRITO, F.L.; ROLIM, M.M.; PEDROSA, E.M.R. Efeito da aplicação de vinhaça nas características químicas de solos da zona da mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.4, n.4, p.456-462, 2009.
- (7) BRASIL. Portaria do Ministério do Interior nº 323 de 29 de novembro de 1978.
- (8) CHRISTOFOLETTI, C.A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.
- (9) PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G.T.; FONTANETTI, C.S. Mutagenic Action of Sugarcane Vinasse in the *Tradescantia Pallida* Test System. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 4, n. 1, 2014.
- (10) MARIANO, A.P. et al. The use of Vinasse as an Amendment to *Ex-Situ* Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Diesel Oil, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1043-1055, 2009.
- (11) GAYLARD, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação, **Biotecnologia**, n. 34, p. 36-43, 2005.
- (12) KAMIDA, H.M. et al. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v.28, n.4, p. 629-632, 2005.
- (13) SILVA, E.G. et al. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2007.
- (14) SCHIMIDT, P. et al. Valor nutritivo do feno de braquiária amonizado com uréia ou inoculado com *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 2040-2049, 2003.
- (15) BONONI, V.L. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis.** 2ªed., São Paulo: Ícone, p. 206, 1999.
- (16) DENCHEV, C.M.; VENTURELLA, G.; ZERVAKIS, G. *Mycoticon Textbook: identification and sustainable exploitation of will edible mushrooms in areas rural.* TEI Thessaly, 2013. Disponível em: http://mycoticon.teilar.gr/attachment/s/38/MYCOTICON%20TEXTBOOK_ALL.pdf>. Acesso em: 19 de abril de 2015.
- (17) VENTURELLA, G. On the real identity of *Pleurotus nebrodensis* in Spain. **Mycotaxon**, v. 84, p. 445-446, 2002.
- (18) VENTURELLA, G.; ZERKAKIS, G; LA ROCCA, S. *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* var. nov. from Sicily. **Mycotaxon**, v. 76, p. 419-427, 2000.
- (19) FERREIRA, L.F.R. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132-137, 2011.
- (20) SIRIANUNTAIBOON, S. et al. An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia* sp. *Bioscience Biotechnology and*

- Biochemistry, v. 59, p. 1185–1189, 1995.
- (21) NEVES, F.A. et al. Aplicação de fungos de decomposição branca para remoção de cor em simulados de efluentes industriais. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 2, n. 2, p. 40-57, 2013.
- (22) VIVE, V.A.; RIZK, M.C. Descoloração da vinhaça utilizando H₂O₂/UV. **Tópos**, v. 7, n. 1, p.41 – 50, 2013.
- (23) SOUZA, R.P. et al. Vinasse treatment using a vegetable-tannin coagulant and Photocatalysis. **Acta Scientiarum Technology**, v. 35, n. 1, p. 89-95, 2013.
- (24) MACHADO, K.M.G. et al. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetes fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 481-487, 2006.
- (25) ARAGÃO, M. et al. Bioremediation of distillery effluent by *Pleurotus sajor-caju*: evaluation of the influence of pH in vinasse derived from molasses. **BMC Proceedings**, v. 8, Suppl. 4, P190, 2014.
- (26) AGUIAR-FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- (27) CORDEIRO, C.C. **Estudo da biodegradação de efluente Kraft por fungos lignolíticos**. 2013. 83f. Monografia (Tecnologia em Processos Ambientais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- (28) REIS, M.F. et al. Análise de substratos alternativos para cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócio Meio Ambiente**, v.3, n.2, p. 79-91, 2010.

Enviado: 14/01/2015

Revisado: 10/08/2015

Aceito: 10/08/2015