



## **Avaliação morfológica da ação de fungos basidiomicetos pertencentes aos biomas Pampa e Mata Atlântica sobre filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

**Micael Montemezzo <sup>1</sup>, Rosmari Nichele Brandalise <sup>1</sup>, Letícia Osório da Rosa <sup>2</sup>, Marli Camassola <sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias/ Universidade de Caxias do Sul

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnologia/ Universidade de Caxias do Sul

### **Resumo**

O constante aumento populacional causa um aumento na produção de diferentes materiais. Assim, materiais poliméricos estão em destaque pela sua resistência química e mecânica e também pelo seu baixo custo de produção. Polietileno é o polímero mais encontrado em aterros lixões, a partir disto, é de extrema importância o desenvolvimento de novas tecnologias, as quais objetivem a diminuição do tempo de degradação e os impactos ambientais associados ao descarte irregular e também no descobrimento de novas rotas de degradação natural, realizadas por microrganismos como fungos e bactérias. A partir disto, este estudo objetivou avaliar a degradação de filmes de polietileno de baixa densidade em estado sólido (placas de Petri), considerando modificações nas propriedades morfológicas e físicas com a massa residual, pela ação de diversas espécies fúngicas, coletadas e isoladas a partir de diferentes substratos pertencentes a dois biomas, Pampa e Mata Atlântica, ambos localizados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Palavras-chave: degradação biótica, PEBD, basidiomicetos

Área Temática: Resíduos sólidos

### ***Morphologic evaluation of the basidiomycetes fungi belonging to the biomes Pampa and Mata Atlântica on low density polyethylene (LDPE) films under Scanning electronic microscopy (SEM)***

### **Abstract**

*The steady increase in population causes an increase in the different materials production. Thereby, the polymeric materials are highlighted by their chemical and mechanical resistance and by their low production costs. Polyethylene is the most found polymer in landfills and dumps, from this, it is important to develop new technologies which aim the decreasing of degradation time and the environmental impacts associated to its irregular disposal and the discovering of new natural pathways made by native microorganisms such as fungi and bacterial species. Given this, this study aimed to assess the biotic degradation of low-density polyethylene films in solid state (Petri dishes), considering their changes in morphological and physical properties by weight loss by the action of several fungi, collected and isolated from different substrates belonging to two different biomes, Pampa and Mata Atlântica, both located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.*

*Key words: biotic degradation, LDPE, basidiomycetes*

*Theme Area: Solid wastes*



## 1 Introdução

Nos dias atuais são produzidos cerca de 260 milhões de toneladas de polímeros sintéticos anuais (NOWAK et al., 2011). A grande maioria deles possui aplicações nas mais diversas áreas da indústria, como em embalagens (sejam elas de produtos alimentícios, farmacêuticos, agrícolas e outros), em meios de transporte, de comunicação, fabricação de tintas, *commodities* e etc, assim, torna-se difícil imaginar uma atividade humana em que os polímeros não estejam envolvidos (RUBIN, 1990).

Os polímeros possuem taxa de durabilidade muito altas, enquanto sua degradabilidade no meio ambiente é baixa, característica essa que vem sendo desenvolvida para melhorar as propriedades do material. Entretanto, estas melhorias nas características têm um alto preço ambiental, a difícil degradação do material por agentes físicos, químicos e biológicos (EUBELER et al., 2010). Os materiais poliméricos possuem uma ampla taxa de acumulação do meio ambiente, como em aterros ou lixões, causando sérios problemas de poluição do solo e corpos d'água, incluindo vastas áreas do oceano (VOLOVA et al., 2010). Uma consequência grave da presença de materiais poliméricos nos oceanos deve-se ao fato de que cerca de 1 milhão de animais marinhos são mortos anualmente por asfixia ou por serem presos em emaranhados de detritos. A asfixia afeta principalmente tartarugas, já que as mesmas se alimentam de cnidários, como as águas-vivas, e por confundirem-se com filmes poliméricos, acabam ingerindo esses materiais (SUDHAKAR et al., 2007).

No Brasil, os principais polímeros produzidos e encontrados nos resíduos sólidos urbanos são os polietilenos (HDPE, LDPE, LLDPE) com 48,9% dos termoplásticos descartados, seguido pelo poli (tereftalato de etileno) (PET) com 19,8%, polipropileno (PP) com 16,%, poli(cloreto de vinila) (PVC) com 6,5%, e o poliestireno (PS) com 5,8%, há ainda a presença de outros materiais somando 2,8%. A grande quantidade de polietilenos e PET é justificada pela sua utilização em embalagens, a qual é uma indústria em expansão, com crescimento na ordem de 12% ao ano (AMARAL et al., 2011; ROMÃO et al., 2009).

Para a diminuição desses resíduos sólidos no meio ambiente, pode-se destacar algumas alternativas, como: desenvolvimento de materiais poliméricos mais duráveis (diminuindo a sua descartabilidade), desenvolvimento de materiais poliméricos de curta duração (visto que possuem tempo diminuto de permanência no ambiente, como os biopolímeros e os polímeros aditivados com agentes pró-degradantes). Além disto, o estudo de microrganismos autóctones, que sejam capazes de degradar substâncias xenobióticas, tem grande importância ambiental pois evita a introdução de espécies exóticas em ambientes naturais (DALMOLIN et al., 2006).

## 2 Materiais e métodos

Foram utilizados filmes de LDPE com 50 µm de espessura, fornecido pela empresa Braskem S.A., extrusados em uma extrusora monorroscas industrial, duplo filete, com a relação comprimento/diâmetro (L/D) de 1:30, em temperaturas de 170°C. O meio de cultivo para a ação microbiana foi composto de 3% ágar-ágar, 2,5% do meio de sais (Mandels e Reese, 1957) em água destilada.







Os microrganismos utilizados neste estudo foram coletados de diversos substratos, em diversas coletas realizadas pelos biomas Pampa e Mata Atlântica, de acordo com a Tabela 1, todos estão armazenados no acervo da Micoteca da Universidade de Caxias do Sul.



# 6º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 10 a 12 de Abril de 2018

Tabela 1 – Espécies fúngicas utilizadas no estudo. S/D – sem dados e S/I – sem imagem

Espécie	Família	Local de coleta	Características do substrato	Imagem
<i>Trametes villosa</i>	Polyporaceae	Caçapava do Sul	Madeira em decomposição	
<i>Lepiota</i> sp.	Agaricaceae	Caçapava do Sul	Solo	S/I
<i>Pleurotus albidus</i>	Pleurotaceae	São Francisco de Paula	Madeira em decomposição	
<i>Macrolepiota</i> sp.	Agaricaceae	São Francisco de Paula	Solo	
<i>Rigidoporus ulmarius</i>	Meripilaceae	Nova Petrópolis	Madeira em decomposição	
<i>Schizophyllum</i> sp.	Schizophyllaceae	São Marcos	Madeira em decomposição	
<i>Trametes membranaceae</i>	Polyporaceae	S/D	S/D	



O cultivo foi feito em placas de Petri, nas quais um fragmento de 5x5cm do filme de PEBD foi colocado na superfície do meio, em seguida, um inóculo de 0,5cm de diâmetro de cada fungo foi semeado sobre o filme. O cultivo perdurou por 28 dias segundo a norma G-21 e as placas foram incubadas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 27°C constante. A caracterização morfológica das amostras antes e após diferentes exposições aos microrganismos foram realizadas em um microscópio óptico marca Bio Photonics® modelo BIO1. Para as análises em microscopia eletrônica, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca JEOL, modelo JSM 6060, operando com tensão de aceleração de 10 kV. As amostras foram recobertas com ouro.

Para a caracterização física, todos os filmes foram secos em estufa a 38°C, pesados antes e depois de sua exposição às linhagens fúngicas. A análise da massa residual ( $M_r$ ) em % foi calculada pela Equação 1.

$$M_r = \left( \frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo  $m_f$  a massa final, após a exposição dos filmes às linhagens fúngicas e  $m_i$  a massa inicial, antes da exposição.

### 3 Resultados e discussão

Ao submeter as amostras à análise de microscopia eletrônica de varredura, verificam-se diversos eventos evidenciando o ataque das diferentes linhagens fúngicas ao substrato polimérico, o qual apresentou-se como única fonte de carbono das células microbianas para seu crescimento e desenvolvimento. Após os 28 dias de cultivo, os filmes foram lavados com água destilada, para retirar o excesso de resíduos ou hifas fracamente aderidas, e secos em estufa a 38°C.

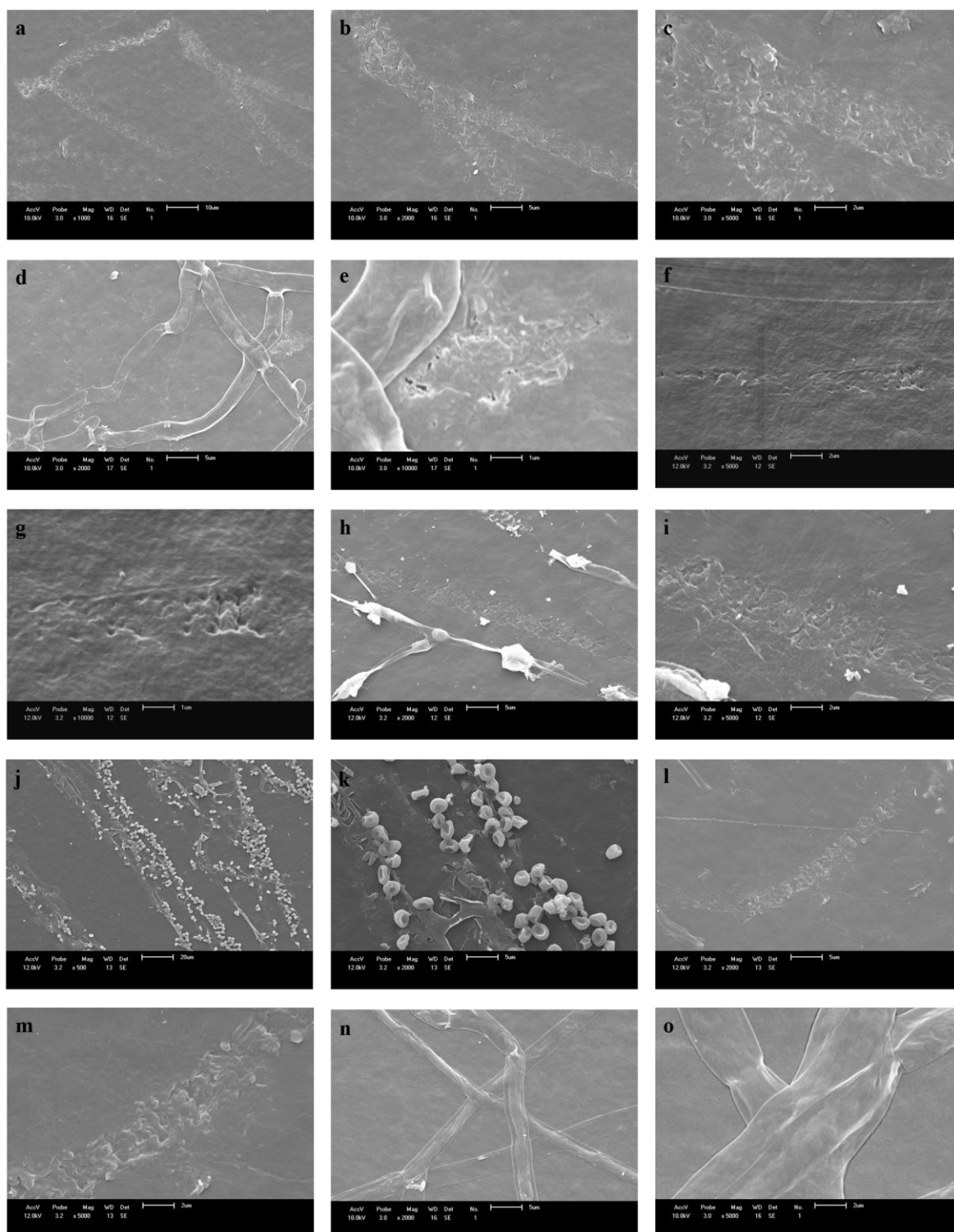
Ao analisar as micrografias (Figura 1), pode-se verificar em todas as imagens (A-O) que o crescimento micelial, representado pela presença de hifas ou de sua impressão deixada sobre o polímero, ocorreu, manifestando assim o reconhecimento do substrato polimérico pelas células fúngicas.

Nas Figuras 1D, 1E, 1J, 1K, 1N e 1O, as quais representam o crescimento micelial das espécies *Lepiota* sp., *Rigidoporus ulmarius* e *Trametes membranaceae*, evidencia-se a presença de hifas bem aderidas ao PEBD, já que as mesmas permaneceram mesmo após o processo de lavagem com água destilada. Na Figura 1J e 1K, evidencia-se a presença de hifas em processo de esporulação, já que diversos esporos estão presentes.

As marcas deixadas pelas linhagens utilizadas neste estudo, como *cracks* e fissuras, corroboram com estudos já realizados na literatura, como o experimento realizado com o fungo dermatófito *Curvularia lunata*, o qual aumentou a degradação de PEBD em condições laboratoriais em até 48% após 296 dias de exposição à matriz polimérica (RAUT et al., 2015). Nowak et al. (2011) também encontraram a colonização de diversas espécies microbianas, tais como as espécies fúngicas *Gliocladium viride*, *Aspergillus awamori* e *Mortierella subtilissima*, sobre o PEBD em um tempo total de cultivo de 225 dias, também em condições laboratoriais. Gu (2003) explica que células microbianas normalmente penetram a matriz polimérica objetivando a sua degradação, resultando no aparecimento de marcas vistas na superfície do polímero utilizado no estudo em questão.



Figura 1: Micrografias das amostras. A, B e C– *Trametes villosa* (1000x, 2000x e 5000x, respectivamente); D e E – *Lepiota* sp. (2000x e 10000x, respectivamente); F e G- *Pleurotus albidus* (5000x e 10000x, respectivamente); H e I- *Macrolepiota* sp. (2000x e 5000x, respectivamente); J e K- *Rigidoporus ulmarius* (500x e 2000x, respectivamente); L e M- *Schizophyllum* sp. (2000x e 5000x, respectivamente); N e O- *Trametes membranaceae* (2000x e 5000x, respectivamente).

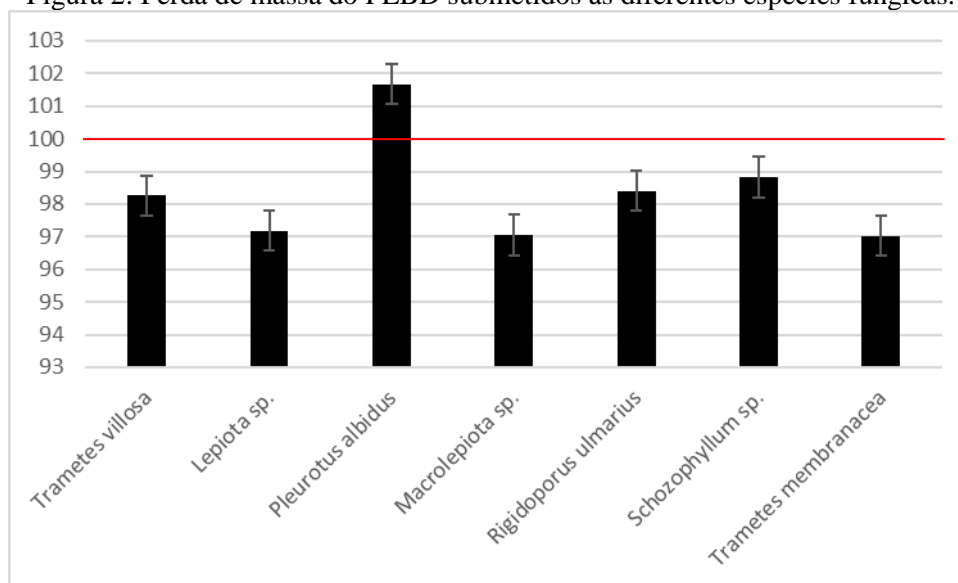




Os dados apresentados na Figura 2 demonstram a perda de massa (%) do PEBD submetido às diferentes espécies fúngicas utilizadas no estudo. Evidencia-se que em quase todas as amostras houve perda de massa, atingindo os valores médios de: 98,26% para *Trametes villosa*, 97,19% para *Lepiota* sp., 97,06% para *Macrolepiota* sp., 98,41% para *Rigidoporus ulmarius*, 98,82% para *Schizophyllum* sp. e 97,02% para *Trametes membranaceae*. De acordo com Flemming (1998), a perda de massa pode ser utilizada como evidência para a utilização da cadeia polimérica como fonte energética por células microbianas, após a secreção de enzimas que catalisam o rompimento do esqueleto carbônico e o internalizam para posterior utilização no metabolismo energético.

Para a espécie *Pleurotus albidus*, o valor de massa residual foi superior aos 100% da massa inicial, o que pode ser indicado pela penetração e incorporação do micélio à superfície polimérica, ocasionando esse incremento à massa mensurada (GU, 2003).

Figura 2: Perda de massa do PEBD submetidos às diferentes espécies fúngicas.



#### 4 Conclusão

No presente trabalho foram estudadas a ação de diversas espécies de fungos basidiomicetos pertencentes aos biomas Pampa e Mata Atlântica do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Pelas análises realizadas é possível verificar a adesão das diferentes espécies fúngicas à superfície polimérica do PEBD, assim como o ataque à matriz polimérica. Também verifica-se a perda de massa significativa do polímero quando submetido a 6 espécies, das 7 estudadas.

#### 5 Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul (UCS), o Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologia (PGEPROTEC) e ao Instituto de Biotecnologia pela realização do trabalho.



## Referências

- AMARAL, G.; BOTTO, A.H.C. 2011. Guia ambiental da indústria de transformação e reciclagem de materiais plásticos. Disponível em [http://file.sindiplast.org.br/download/guia\\_ambiental\\_internet.pdf](http://file.sindiplast.org.br/download/guia_ambiental_internet.pdf)- Acessado em 31.10.2012.
- DALMOLIN, E. **Avaliação da degradação de polietilenos contendo aditivo pró-degradante.** Dissertação Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.
- EUBELER, J.P.; BENHARD, M.; KNEPPER, T. P. Environmental biodegradation of synthetic polymer: Biodegradation of different polymer groups. **Trends in Analytical Chemistry**. 29, p. 84-100, 2010.
- FLEMMING, H.C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation and Stability**. 59, p. 309-315, 1998.
- GU, J.D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 52, p. 69-91, 2003.
- MANDELS, M., REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**. 73(2), p. 269-278, 1957.
- MUMTAZ, T., KHAN, M.R., HASSAN, M.A. Study of environmental biodegradation of LDPE films in soil using optical and scanning electron microscopy. **Micron**. 41, p. 430-438, 2010.
- NOWAK, B.; PAJAK, J.; DROZD-BRATKOWICZ, M.; RYMARZ, G. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. **International Biodegradation and Biotederioration**. 65(6), p. 757-767, 2011.
- RAUT, S.; RAUT, S.; SHARMA, M.; SRIVASTAV, C.; ADHIKARI, B.; SEN, S.K. Enhancing Degradation of Low Density Polyethylene Films by *Curvularia lunata* SG1 Using Particle Swarm Optimization Strategy. **Indian Journal of Microbiology**. 55(3), p. 258–268, 2015.
- ROMÃO, W.; SPINACÉ, M.A.S.; DE PAOLI, M.A. Poli (Tereftalato de Etileno), PET: Uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**. 19, p. 1-12, 2009.
- RUBIN, I.I. **Handbook of plastic materials and tecnologia**. New York: J. Wiley, 1990, 1745 p.
- SUDHAKAR, M., TRISHULA, A., DOBLE, M., KUMAR, K.S., JAHAN, S.S., INBAKANDAN, D., VIDUTHALAI, R.R., UMADEVI, V.R., MURTHY, P.S., VENKATESAN, R. Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters. **Polymer Degradation and Stability**. 92, p. 1743-1752, 2007.
- VOLOVA, T.G.; BOYANDIN, A.N.; VASILIEV, A.D.; KARPOV, V.A.; PRUDNIKOVA, V.; MISHUKOV, O.V.; BOYARSKIKH, U.A.; FILIPENKO, M.L.; RUDNEV, V.P.; XUÂN, B.B.; DUNG, V.V.; GITELSON, I.I. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. **Polymer Degradation and Stability**. 95, p. 2350-2359, 2010.



## 6º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 10 a 12 de Abril de 2018