

TRATAMENTO MICROBIOLÓGICO DE ARGILAS

Alírio de CARVALHO*
Tereza Cristina Costa VIVI**
Mária de Lourdes BURINI**
Teresa Marilene BRONHARO**
Nilso BARELLI*

■ RESUMO: Ao se estudarem as condições necessárias e a possibilidade de aplicação de tratamento microbiológico a argilas com teor de ferro elevado (visando-se à diminuição ou à eliminação deste elemento químico) para a utilização das mesmas na produção de cerâmicas refratárias, os resultados obtidos mostraram que o tratamento microbiológico é possível. Entre os microrganismos empregados, observou-se que os mais eficientes são o *Aspergillus oryzae*, o *Streptomyces aureofaciens* e a *Escherichia coli*, com reduções de 51% a 54% (no processo sem agitação) e de 61% a 64% (no processo com agitação), em experimentos com duração de 7 dias (30°C; 250 rpm). Tendo-se selecionado o *A. oryzae*, verificou-se, através das curvas de redução do teor de ferro das amostras de argila, que o processo com agitação é sempre mais eficiente do que o processo sem agitação, quando são utilizados meios nutrientes contendo, por litro, glicose 40 g, peptona 10 g e pH 6,5. Os resultados obtidos mostram também que, nas condições de trabalho, 150 ml de meio nutriente e 1,0 ml de inóculo são adequados ao serem utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 ml e 5 g de argila por frasco. Verificou-se que, se a mesma amostra de argila for submetida a mais de um tratamento microbiológico, é possível obter-se argila com teor de ferro inferior a 1%, o que possibilita sua utilização na indústria de cerâmicas refratárias. Estudou-se ainda a substituição dos componentes do meio nutriente, objetivando-se a obtenção de meios mais econômicos e/ou mais eficientes, tendo-se observado que é possível essa substituição por caldo de cana-de-açúcar diluído contendo ou não outros aditivos. Constatou-se que a redução do teor de ferro da argila será significativamente aumentada se, ao caldo de cana-de-açúcar diluído, for adicionado extrato de levedo na concentração 1 g/l, o que abre a possibilidade de se obter a redução desejada, através de um único tratamento microbiológico.

■ UNITERMOS: *Aspergillus oryzae*; argilas; tratamento microbiológico; cerâmica refratária; redução de teor de ferro.

* Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação – Instituto de Química de Araraquara – UNESP – 14800-900 – Araraquara – SP.

** Alunas de Iniciação à Pesquisa Científica – Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação – Instituto de Química de Araraquara – UNESP – 14800-900 – Araraquara – SP.

Introdução

As características físicas e químicas do solo determinam a natureza do meio ambiente em que se desenvolvem os microrganismos. Estes, por sua vez, atuam sobre os componentes do solo provocando alterações importantes, não só para os próprios microrganismos, mas também para os vegetais como, por exemplo, transformações envolvendo compostos do ferro.

Um dos maiores constituintes da crosta terrestre é o ferro, o qual, apesar de ser apenas um nutriente secundário para o crescimento dos microrganismos no solo, sofre transformações provocadas pela atividade microbiana.

A influência dos microrganismos na solubilização de compostos de ferro na natureza é conhecida há longo tempo^{3, 4, 6, 8, 9}. A solubilização pode ocorrer, entre outras formas, através da formação de ácidos e criação de condições de redução¹. Na presença de substâncias fermentescíveis, ácidos orgânicos são formados e, sem dúvida, estes ácidos exercem uma ação solvente sobre compostos contendo ferro.

Assim, fica claro que "microrganismos em condições favoráveis podem exercer uma forte ação redutora e solubilizadora sobre compostos de ferro, especialmente no solo e em suspensões coloidais que apresentem grande área de superfície"².

Por outro lado, argilas com teor de ferro superior a 1% apresentam problemas na utilização industrial para obtenção de cerâmicas refratárias.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo das condições e da possibilidade de aplicação do tratamento microbiológico em argilas com teor elevado de ferro, visando-se a diminuição deste elemento químico.

Pesquisou-se também a possibilidade de aplicação de materiais de menor custo no tratamento, por exemplo meios nutrientes baratos, tendo-se em vista viabilizar futura aplicação industrial. A atividade microbiana foi acompanhada através de análises químicas de determinação da concentração de ferro nas amostras de argila⁷.

Material e métodos

Amostra Mineral

As argilas utilizadas neste trabalho, fornecidas pela empresa "Cerâmica Refratários Togni" de Poços de Caldas (MG), a quem agradecemos, apresentavam granulometria inferior a 0,149 mm e teor de ferro variando entre 2% e 36%.

Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram os seguintes: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus amstelodami*, *Streptomyces aureofaciens* e *Escherichia coli*.

Meio nutriente para preparação dos inóculos

Este meio continha, por litro, glicose 40 g, peptona 10 g, ágar 20 g e pH 6,5. Foi sempre usada água destilada para a preparação dos meios.

Preparação dos inóculos

Os inóculos foram preparados pela adição de 8 ml de água destilada esterilizada a um tubo de cada cultura (ágar inclinado). As suspensões de esporos (para os bolores) e de células (para as bactérias) foram obtidas raspando-se suavemente a superfície do meio com espátula estéril.

Preparação de suspensão de esporos de *Aspergillus oryzae*

Preparou-se maior volume de suspensão de esporos de *A. oryzae*, inoculando-se 6 frascos de Roux, contendo 200 ml do meio indicado, com 1,5 ml da suspensão de esporos obtida anteriormente e espalhando-se uniformemente o inóculo sobre o meio nutriente. Os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 30 dias.

Adicionaram-se, então, 200 ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi obtida da maneira já citada. A suspensão preparada foi assepticamente homogeneizada em liquidificador de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 10 a 30 ml, para frascos estéreis de 50 ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, os frascos foram conservados em câmara fria (5°C).

Esterilização dos meios de cultivo e outros materiais

A esterilização foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 121°C durante 30 minutos.

Técnica do tratamento microbiológico

O processo com agitação empregado para permitir o crescimento dos microrganismos foi o de "frascos agitados". Assim, a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa, em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação (250 rpm). Utilizaram-se frascos de 250 ml, contendo 150 ml de meio nutriente, 5 gramas de argila e 1,0 ml de inóculo.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 1 cm de espessura, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C, em experimentos de duração variável conforme será indicado em cada caso.

No processo sem agitação, os frascos eram mantidos em estufa também a 30°C.

Separação da argila após crescimento do microrganismo

Após serem retirados os frascos da sala de fermentação, os caldos das culturas (suspensão de células e argila no caldo líquido) foram filtrados em funil de Buchner. O micélio e a argila retidos no funil foram lavados com água destilada.

Após a filtração, adicionou-se, em um becker, água destilada ao micélio e argila e agitou-se com uma bagueta inicialmente, e depois em agitador magnético, para que ocorresse a separação da argila do micélio e filtrou-se em peneiras da série Granutest de malhas 0,210 mm e 0,149 mm, respectivamente, lavando-se com água destilada.

Nestas condições, o micélio ficava retido na peneira, enquanto a argila permanecia na suspensão.

A argila separada, depois de seca em estufa a 90°C, foi triturada em almofariz de porcelana e utilizada para análise química de determinação do teor de ferro.

Análise química da argila

A concentração de ferro nas amostras de argila foi determinada pelo método do dicromato, segundo Vettori⁷.

Resultados

Seleção de microrganismos

Os resultados obtidos, ao se comparar a capacidade de redução do teor de ferro da argila por vários bolores do gênero *Aspergillus* e duas bactérias, estão indicados na Tabela 1 e mostram que, entre as espécies empregadas, as mais promissoras são o *Aspergillus oryzae*, o *Streptomyces aureofaciens* e a *Escherichia coli*, com reduções de ferro de 51% a 54% (no processo sem agitação) e de 61% a 64% (no processo com agitação).

Tabela 1 - Redução do teor de ferro da argila após 7 dias de crescimento microbiano

Microrganismos	Redução obtida (%)	
	sem agitação	com agitação
<i>A. oryzae</i> NRRL 692	54,4	64,4
<i>S. aureofaciens</i> NRRL-B-1286	53,9	61,1
<i>E. coli</i> *	51,1	64,4
<i>A. niger</i> ATCC 1015	51,1	56,1
<i>A. carbonarius</i> **	51,1	56,1
<i>A. niger</i> ATCC 16404	48,9	61,1
<i>A. flavus</i> EPM 157	48,9	61,1
<i>A. amstelodami</i> ***	45,0	59,4
<i>A. niger</i> ATCC 337	43,3	59,4

* Cultura recebida da Laboratória-Bristol S.A.

** Cultura recebida da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" de Piracicaba.

*** Cultura recebida da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Teor inicial de ferro da argila: 36%.

Meio nutriente utilizado: glicose 40 g/l, peptona 10 g/l e pH 6,5. Volume de meio: 150 ml. Volume de inóculo: 1 ml.

Influência do tempo de crescimento do *Aspergillus oryzae* na redução do teor de ferro da argila

Comparando-se as curvas obtidas (Figura 1), observa-se que o processo com agitação é sempre mais eficiente que o processo sem agitação.

Influência do volume de meio nutriente

Os resultados obtidos estão indicados na Figura 2 e mostram que, nas condições de trabalho, 150 ml de meio de cultivo é o volume mais adequado, quando se utilizam frascos de Erlenmeyer de 250 ml.

Influência do volume de inóculo

A Figura 3 mostra que, nas condições do experimento, basta 1,0 ml de inóculo por frasco.

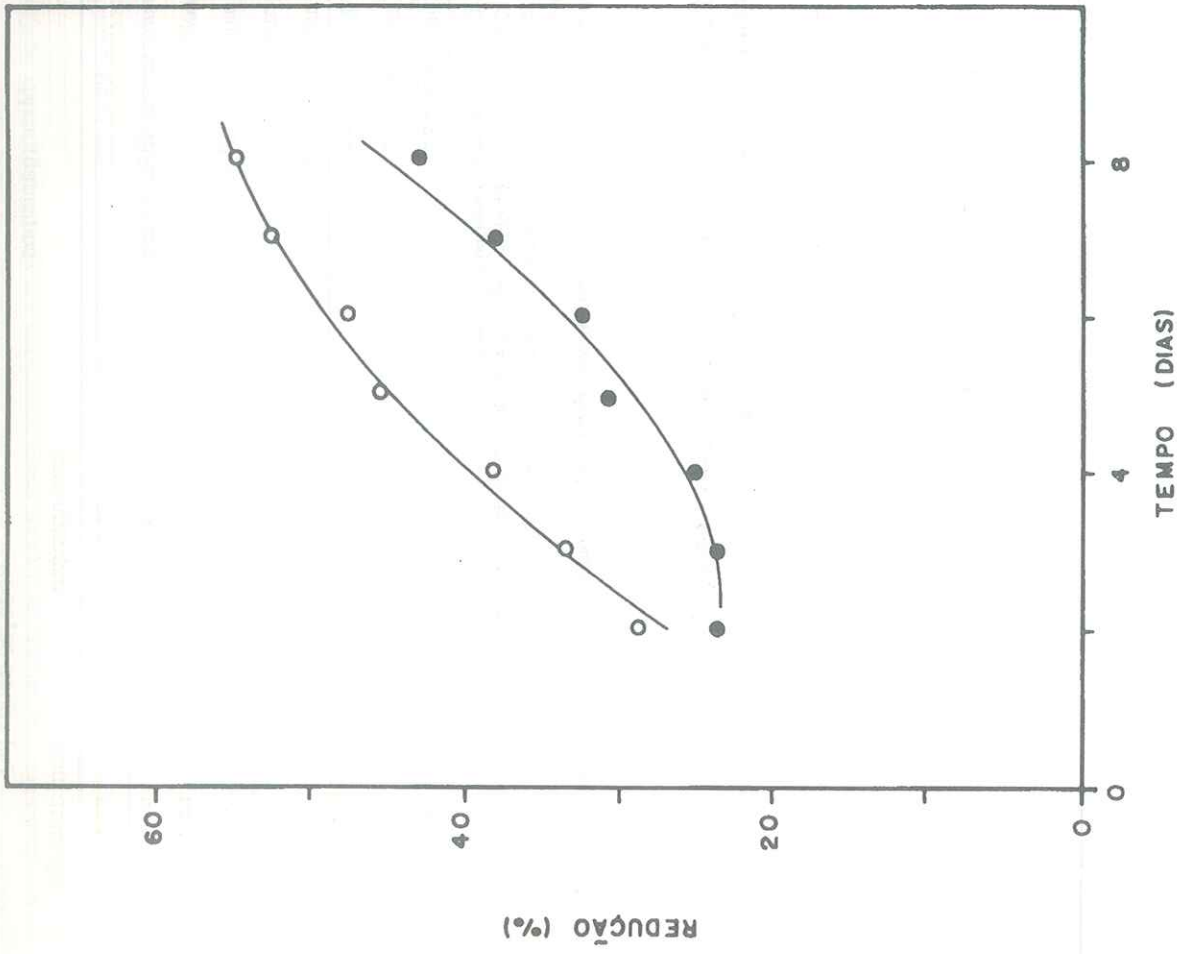


FIGURA 1 - Redução do teor de ferro da argila em função do tempo de crescimento do *Aspergillus oryzae*, usando-se processo com agitação (°) e processo sem agitação (•). Teor inicial de ferro da argila: 7,9%.

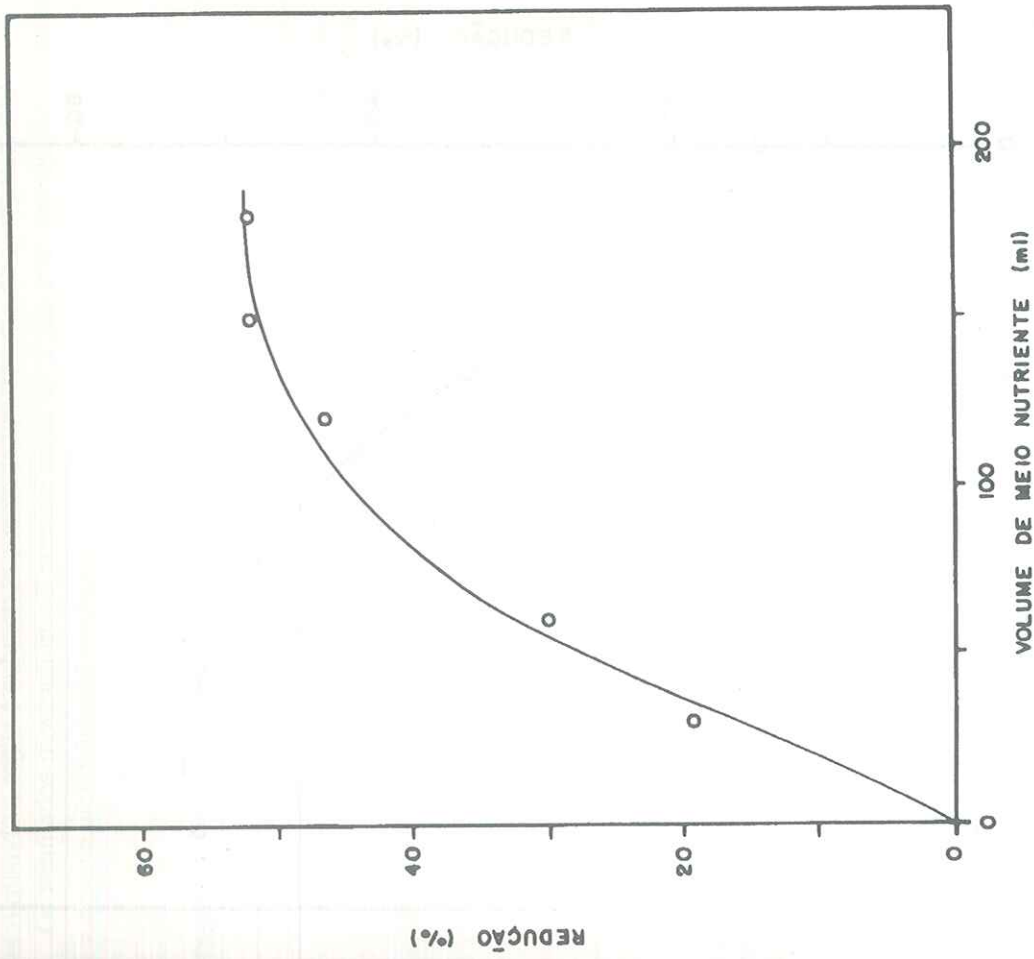


FIGURA 2 - Influência do volume de meio nutriente na redução do teor de ferro da argila, quando se usa processo com agitação.

Condições de trabalho: Tempo de crescimento do *A. oryzae*: 7 dias; volume de inóculo: 1 ml; teor inicial de ferro da argila: 7,9%.

Tratamento microbiológico múltiplo

A Tabela 2 contém os resultados obtidos ao se estudar a redução do teor inicial de ferro quando a argila é submetida a mais de um tratamento microbiológico.

Os resultados mostram que é possível obter-se argila com teor de ferro inferior a 1% através do tratamento múltiplo.

Tabela 2 - Influência de tratamentos microbiológicos consecutivos (tratamento múltiplo) na redução do teor de ferro da argila

Tratamento nº	Teor inicial de ferro (%)	Teor final de ferro (%)	Redução obtida (%)	Redução acumulada (%)
1	10,6	4,9	53,8	53,8
2	4,9	2,4	51,0	77,4
3	2,4	1,2	50,0	88,7
4	1,2	0,6	50,0	94,3

Condições de trabalho:

Volume de meio nutriente: 150 ml.

Volume de inóculo: 1 ml.

Tempo de crescimento do *A. oryzae* em cada tratamento: 7 dias.

Meio nutriente: glicose 40 g/l, peptona 10 g/l e pH 6,5.

Processo: com agitação.

Argila: 5 g por frasco.

Substituição de componentes do meio nutriente

Estudou-se ainda a substituição dos componentes do meio, objetivando-se a obtenção de meios mais econômicos e/ou mais eficientes. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 3 e mostram que é possível a substituição do meio de cultivo, inicialmente utilizado, por caldo de cana-de-açúcar diluído contendo ou não outros aditivos como, por exemplo, extrato de levedo na concentração 1 g/l.

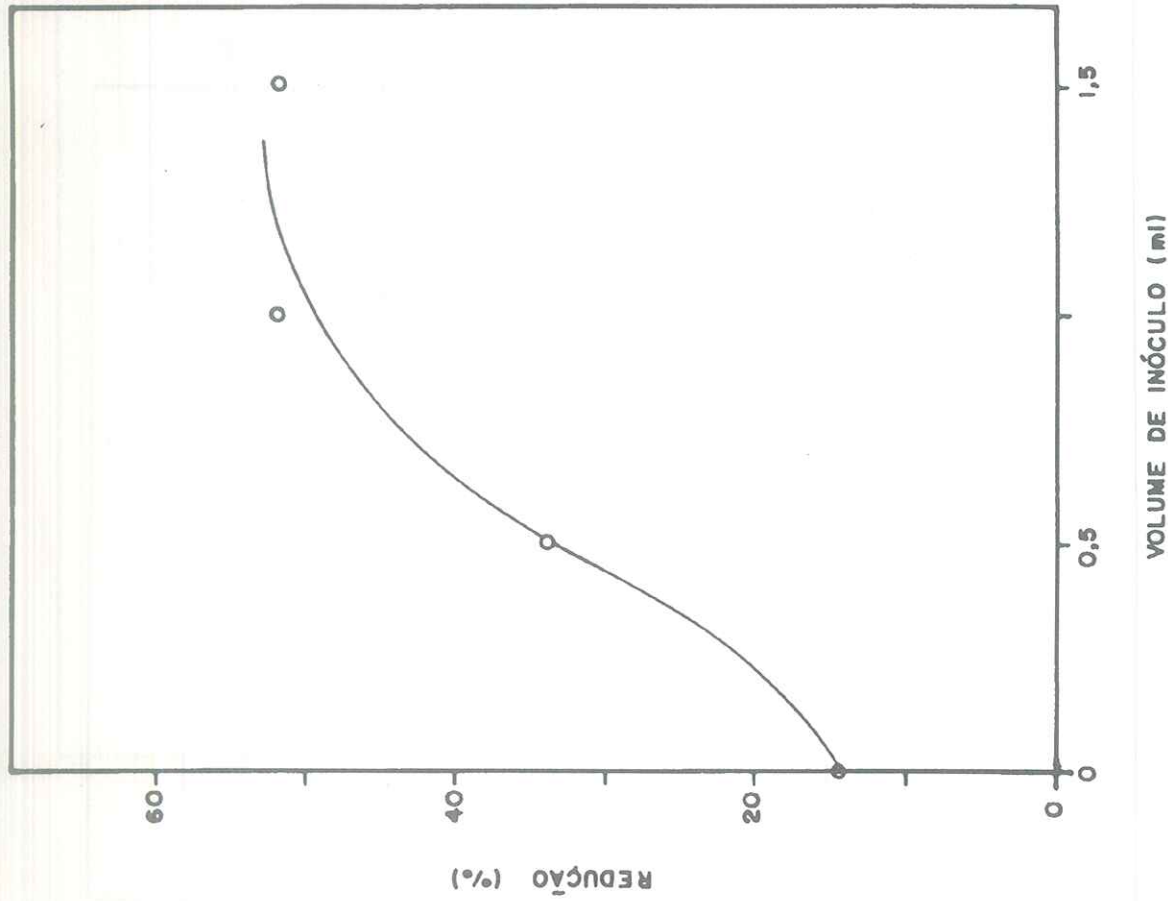


FIGURA 3 - Influência do volume de inóculo na redução do teor de ferro da argila, quando se usa processo com agitação.

Condições de trabalho: Tempo de crescimento do *A. oryzae*: 7 dias; volume de meio nutriente: 150 ml; teor inicial de ferro da argila: 7,9%.

Tabela 3 - Influência da substituição do meio nutriente, inicialmente utilizado, por caldo de cana-de-açúcar contendo ou não outros aditivos na redução do teor de ferro da argila

Meio nutriente	pH inicial	Redução (%)
1	5,5	48,5
2	5,5	46,6
3	6,5	55,3
4	-	49,4
5	-	75,7
6	6,5	52,5

Meios nutrientes utilizados:

1. Caldo de cana-de-açúcar (sem ajuste de pH).
2. Caldo de cana-de-açúcar diluído com água destilada (1:3) sem ajuste de pH.
3. Caldo de cana-de-açúcar diluído (1:3) com ajuste de pH.
4. Caldo de cana-de-açúcar diluído (1:3) mais peptona (1g/l) sem ajuste de pH.
5. Caldo de cana-de-açúcar diluído (1:3) mais extrato de levedo (1 g/l) sem ajuste de pH.
6. Meio nutriente inicial.

Condições de trabalho:

Volume de meio: 150 ml.
 Volume de inóculo: 1 ml.
 Tempo de crescimento do *A. oryzae*: 7 dias.
 Processo: com agitação.
 Argila: 5 g por frasco.
 Teor inicial de ferro da argila: 10,6%.

Discussão

Ribeiro et al.⁵ investigaram o ataque de cultura de *Aspergillus niger*, isolada do solo, sobre rocha máfica, e observaram notável ação solubilizadora do ferro contido nestes minerais.

Neste trabalho, procurou-se utilizar, além de *A. niger*, outras espécies de *Aspergillus* e também duas bactérias, sendo uma delas filamentosa.

Na seleção inicial, verificou-se (Tabela 1) que, entre os microrganismos utilizados, o *A. oryzae* havia se mostrado como o mais promissor para o tratamento microbiológico. Com este fungo, conseguiu-se redução, no teor de ferro da argila usada, de 54,4% no processo sem agitação e de 64,4% no processo com agitação, em experimentos com 7 dias de duração. Em seguida aparecem as bactérias *E. coli* e *S. aureofaciens* com resultados bastante próximos aos apresentados pelo *A. oryzae*.

Para a maioria das espécies utilizadas, o tempo de crescimento de 7 dias já é suficiente para se atingir o máximo de redução. Verificou-se também, para o *A. oryzae*, que a redução é de 50% quando o teor inicial de ferro na argila for de apenas 2%.

Em vista dos resultados obtidos, foi selecionado o *A. oryzae* para continuação do trabalho, e, a Figura 1, que relaciona a redução do teor de metal na argila em função do tempo de crescimento do microrganismo, mostra que, para a remoção do ferro, o processo com agitação é sempre mais eficiente do que o processo sem agitação. Escolheu-se o tempo de 7 dias de tratamento microbiano, para as experiências posteriores, tendo-se em vista a pequena redução (4,8%) ocorrida no oitavo dia de tratamento.

Estudaram-se, a seguir, outras condições do tratamento envolvidas no processo, tais como o volume de meio nutriente e o volume de inóculo, por frasco, tendo-se verificado (Figuras 2 e 3) que as condições usadas, ou seja, 150 ml de meio de cultivo e 1 ml de inóculo, por frasco, eram adequadas. Observou-se também (Figura 3) que, na ausência do microrganismo, a redução do teor de ferro da argila foi de apenas 14%.

Os resultados obtidos, ao se fazer o tratamento múltiplo da mesma amostra de argila, mostraram (Tabela 2) que é possível a obtenção de argila com teor de ferro inferior a 1% quando o material é submetido a tratamentos microbiológicos consecutivos. Estes resultados são importantes porque possibilitam a obtenção de cerâmicas refratárias a partir de depósitos de argila antes condenados para este fim por apresentarem elevados teores do metal.

Vimos, então, ser possível a redução do teor de ferro da argila no meio nutriente usado. No entanto, é processo relativamente pouco comum a utilização industrial de meios de cultivo quimicamente definidos, sendo empregados, de preferência, meios constituídos de nutrientes complexos, usualmente resíduos ou subprodutos da indústria agropecuária, por serem econômicos e eficientes. Por esse motivo, neste trabalho, procurou-se substituir os componentes do meio de cultivo, inicialmente utilizado, pelo caldo de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos mostraram que é possível essa substituição por caldo de cana-de-açúcar diluído, ajustando-se o pH inicial deste para 6,5. Verificou-se também que a redução do teor de ferro da argila será significativamente aumentada se, ao caldo de cana-de-açúcar diluído, for adicionado extrato de levedo na concentração 1 g/l, o que abre a possibilidade de se obter a redução desejada através de um único tratamento microbiológico, o que viabiliza estudos futuros de aplicação industrial do processo.

■ **ABSTRACT:** A study was made to investigate the necessary conditions and possibilities of applying microbiological treatment to clays with high iron content, with the objective of reducing or eliminating this element, in order to use them in the production of refractory ceramics. The results showed that this process was possible. Among all the microorganisms used, the best were *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces aureofaciens*, and *Escherichia coli*, with reductions of 51% to 54% (without agitation) and reductions of 61% to 64% (with agitation), during seven days of microbial growth (at 30°C and 250 rpm). After selecting *A. oryzae*, it was observed, by the reduction curves of iron concentration, that the process is much more efficient with, than without agitation, using a nutrient media containing (per liter) 40 g of glucose, 10 g of peptone, and a pH of 6.5. The results showed that, under normal treatment conditions, 150 ml of nutrient medium and 1.0 ml of inoculum culture were adequate, when using 250 ml Erlenmeyer flasks containing 5 g of clay. The best results, i.e., clays with an iron content below 1%, are obtained when the clay samples are submitted to the microbial treatment more than one time, or only once, if the nutrient medium is substituted by diluted sugar cane juice plus yeast extract (1g/l).

■ **KEYWORDS:** *Aspergillus oryzae*; clays; microbiological treatment; refractory ceramics; reduction of iron content.

Referências bibliográficas

1. ALEXANDER, M. *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1964. p. 387
2. ALLISON, L. E., SCARSETH, G. D. *J. Am. Soc. Agron.*, v. 34, p. 616, 1942.
3. KINDLER, A. *Poggendorff's Ann. Phy. Chem.*, v. 37, p. 203, 1836.
4. LIESKE, R. *Jahrb. Wiss. Bot.*, v. 50, p. 328, 1912.
5. RIBEIRO, R. M., SANTOS, A. M., MARTELLI, H. L. R. *Bras. Geociênc.*, v. 6, p. 146, 1976.
6. STARKEY, R. L., HALVERSON, H. O. *Soil Sci.*, v. 24, p. 381, 1927.
7. VETTORI, L. *Bol. Téc. Minist. da Agric.*, v. 7, p. 6, 1969.
8. WINOGRADSKY, S. *Bot. Ztg.*, v. 46, p. 262, 1888.
9. WRIGHT, D. Jr. *Calif. Univ. Pub. Agr. Sci.*, v. 4, p. 245, 1922.

Recebido em 30.9.1992.

Aceito em 5.12.1992.