V Seminário de Iniciação Científica
Talentos da Ciência e Tecnologia em ação
Dias 26 e 27 de setembro de 2019
Auditório e Pátio - Unidade II
UNIFESSPA | PROPIT

ISOLAMENTO DE FUNGOS CELULOLÍTICOS DE SOLO DO AMBIENTE AMAZÔNICO E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE CELULASES

Taiana Sousa Bezerra (Bolsista/Apresentador)[1] – Unifesspa taianasousa@unifesspa.edu.br
Darlisson de Alexandria Santos (Coordenador (a) do Projeto)[2] - Unifesspa
darlisson@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: CNPq Eixo Temático/Área de Conhecimento: Química Orgânica

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas linhagens fúngicas produtoras de enzimas celulolíticas é uma grande demanda mundial devido a necessidade de encontrar alternativas aos combustíveis fósseis, os quais são responsáveis por grande parte da poluição atmosférica. Esta busca torna-se ainda mais plausível quando as alternativas encontradas podem solucionar o maior empecilho do uso de combustíveis de fontes renováveis: a competição com a produção de alimentos. Esta competição existe devido ao fato de que o etanol produzido atualmente usa, na maioria dos casos, matéria-prima que também é usada como alimento. Nos EUA usa-se o milho como matériaprima e no Brasil usa-se cana-de-açúcar, que é também usada para a produção de sacarose (MOHAMMADI et al., 2011).

Dentre as espécies fúngicas capazes de produzir celulases, reportadas em estudos recentes, existem aquelas isoladas do ambiente amazônico, o qual é uma enorme reserva de biodiversidade no mundo e possui muitos micro-ecossistemas e condições climáticas ideais para o crescimento fúngico (SOUZA et al., 2018). Uma das espécies fúngicas de ambiente amazônico relatadas como produtoras de celulase é o Trichoderma harzianum, com duas linhagens desta espécie sendo reportadas em trabalhos diferentes atestando tal capacidade. O primeiro trabalho, reportado por Delabona et al. (2012), mostrou que as celulases produzidas pela linhagem T. harzianum P49P11 possuem uma grande atividade frente ao bagaço de cana-de-açúcar tratado com explosão a vapor (DELABONA et al., 2012).

O outro trabalho foi realizado por Souza et al. (2018), no qual usou a linhagem T. harzianum 422 obtendo-se também uma boa atividade das celulases frente ao bagaço de cana-de-açúcar, este tratado com moinho de bolas e tratamento hidrotérmico (SOUZA et al., 2018). Espécies fúngicas do gênero Aspergillus também já foram relatadas como isoladas do ambiente amazônico e com capacidade de produzir celulases com boas atividades enzimáticas. São elas A. niger P47C3 e A. fumigatus P40M2, que produziram celulases usando diferentes substratos para cultivo. A potencialidade dos microrganismos de ambiente amazônico na produção de celulases é enorme, embora seja pouco estudada. Um exemplo é o trabalho descrito por Toyama et al. (2018) que descreve a descoberta de uma D-glicosidase, uma das enzimas do complexo celulásico, através de uma análise metagenômica da água do lago Poraquê (TOYAMA et al., 2018). A descoberta do gene de uma celulase presente em microrganismos de ambiente aquático mostra que ainda há muito a se conhecer acerca da microbiota amazônica e seu potencial biotecnológico.

---

[1] Graduanda em Educação - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

[2] Doutora em Educação - Professora Titular Adjunta da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACED/ICH/Unifesspa). Coordenadora do Programa de Extensão Relações Étnico-Raciais e Cidadania.

2. MATERIAS E MÉTODOS

Os reagentes usados para o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos de diversos fabricantes (Synth, Sigma, Chemco, Neon, Kasvi, Spectrum, Acumedia e Mercado Local).

2.1 Coleta das amostras de solo e isolamento dos microrganismos

As coletas de solo foram realizadas em diferentes pontos da UNIFESSPA campus II, a amostra I foi coletada em área em decomposição, já a amostra II foi coletada em solo com um pouco de folhas em decomposição formando uma camada muito fina sobre o solo. As amostras foram armazenadas em frascos estéreis até o uso posterior no isolamento das colônias. O isolamento e quantificação dos fungos foram realizados através do método de diluição seriada.

2.2 Cultivo dos fungos

2.2.1 Meio de cultura contendo extrato de malte

Para o crescimento e obtenção das colônias puras dos fungos foi utilizado o meio de cultura extrato de malte 2% e o pH do meio foi ajustado para 4. A solução foi esterilizada em autoclave em pressão de 120 atm durante 20 min. Logo após a retirada da autoclave os meios foram vertidos na capela de fluxo laminar. Em seguida os fungos foram inoculados nos meios de cultura de extrato de malte e as placas foram vedadas com parafilme e incubados na estufa a temperatura de 29 °C. Para as etapas posteriores foi preparada uma solução de esporos de cada linhagem fúngica isolada, a fim de padronizar o inóculo.

2.3 Fermentação em estado sólido

O meio sólido foi preparado pela adição de farelo de trigo (5,0 g) e 10 mL de uma solução aquosa contendo ureia (0,30 $g.L^{-1}$), peptona (0,75 $g.L^{-1}$), $(NH_4)_2SO_4$ (1,40 $g.L^{-1}$), KH_2PO_4 (2 $g.L^{-1}$), $MgSO_4.7H_2O$ (0,30 $g.L^{-1}$), $CaCl_2.2H_2O$ (0,40 $g.L^{-1}$), $ZnSO_4$ (1,40 mg. L^{-1}), $FeSO_2.7H_20$ (5,00 mg. L^{1}), $CoCl_2.6H_2O$ (2,00 mg. L^{-1}) e $MnSO_4.5H_2O$ (1,60 mg. L^{-1}) em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O pH da solução foi ajustado para 6 antes de cada experimento e o meio foi esterilizado em autoclave durante 20 min. Em seguida os fungos foram inoculados nos meios de cultura contendo farelo de trigo através de solução de esporos, na concentração de 5.10^5 esporos/grama de substrato e incubados em estufa por 3 dias a 32 °C.

2.4 Extração do caldo enzimático contendo as celulases

Após o período de crescimento dos fungos foi realizada a extração das enzimas totais adicionando-se aos frascos Erlenmeyer de 125mL tampão acetato de sódio (CH_3COOH/CH_3COONa^+, 0,05 mol. L^{-1}, pH 4,5) na relação 10 mL de tampão para 1 g de substrato (farelo de trigo). Em seguida o meio foi macerado e triturado e logo após o mesmo foi utilizando-se de um agitador magnético de bancada a solução é agitada vigorosamente durante 60 min. Após 60 min a mistura foi filtrada a vácuo para a retirada do material sólido. A solução resultante foi transferida para tubos Falcon de 15 mL e usada posteriormente para avaliação da atividade celulolítica do extrato enzimático. A avaliação da atividade foi realizada logo após a obtenção do extrato enzimático.

2.4.1 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

A concentração de açúcares foi determinada usando o método DNS (MILLER, 1959). A fórmula geral (Equação 1) utilizada para o cálculo da atividade FPase foi adaptada de Ghose (1987).

Equação 1. Determinação das atividades celulolíticas. Atividade
= □□□ x _____ (Eq.1) , . .

ART: açúcares redutores totais;
Vt: volume total do ensaio;
Ve: volume de extrato enzimático usado;
0,18: massa referente a 1 μmol de glicose;
t: tempo de reação (min).

2.4.2 Determinação da atividade de celulases totais (FPAse)

A tira de papel foi cortada em formato espiral e colocada dentro do tubo de ensaio, ao mesmo foi adicionado 0,33 ml de caldo enzimático, 033 ml de água destilada e 1 ml de solução de DNS ao qual os mesmos foram submetidos ao banho maria na temperatura constante de 50 C durante 5 min. Após isso os tubos foram resfriados e utilizados para analises futuras. O branco ou controle dos experimentos foi feito sem a presença do papel de filtro, mas usando-se as mesmas condições reacionais

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e purificação de linhagens fúngicas do solo do Campus II

Foi possível realizar o isolamento de oito fungos do solo da região arborizada do Campus II da Unifesspa, sendo que os mesmos foram codificados e descritos de acordo com os aspectos físicos das hifas por eles produzidas (Tabela 2). Foi feita a codificação de acordo com a área em que o solo foi tirado A1 (área) e C2 denomina o campus da universidade, e os numerais que vêm no final do código denominam a numeração atribuída a cada linhagem durante o processo de purificação das mesmas. Conseguiu – se purificar um total de 08 linhagens.

Tabela 2. Linhagens fúngicas isoladas no Campus II da Unifesspa e descrição visual dos mesmos

Código	Descrição visual da colônia
A1C2-01	Hifas e esporulação amarela com alguns esporos pretos
A1C2-02	Hifas e esporos de coloração semelhante ao marfim
AIC2-03	Hifas pretas com esporos pretos
A1C2-04	Hifas brancas levemente algodonosas e esporos verdes
A1C2-05	Hifas brancas levemente algodonosas e esporos verdes
A1C2-06	Hifas brancas e esporos pretos
A1C2-07	Hifas verdes com esporos verdes
A1C2-08	Hifas brancas com esporos verdes

Foi possível notar que há uma grande variabilidade de linhagens fúngicas no solo do Campus II da Unifesspa, sobretudo ao observar os aspectos físicos das linhagens até agora isoladas, que apresentam características físicas diferentes, denotando que tratam-se de espécies fúngicas diferentes. Todas estas linhagens fúngicas isoladas apresentaram produção de esporos durante o seu crescimento, favorecendo a sua manipulação nas etapas posteriores do trabalho. No entanto, uma linhagem (A1C2-01) não produziu esporos suficientes para a realização da contagem do mesmo, sendo a contagem realizada para as demais 7 linhagens. As linhagens isoladas em meio de cultura sólido (extrato de malte + ágar) estão listadas e apresentadas na Figura 1.

3.2 Determinação da atividade celulolítica das linhagens isoladas

Das oito linhagens isoladas e purificadas, cinco delas foram avaliadas acerca de sua capacidade em produzir enzimas celulases. Notou-se que todas as cinco linhagens estudadas apresentaram atividade celulolítica. As atividades obtidas, foram expressas em $U.mL^{-1}$, considerando-se o extrato enzimático (total de 50 mL de extrato enzimático), e em $U.g^{-1}$de substrato, considerando a massa de farelo de trigo utilizado (5 g) para o cultivo dos fungos, e estão descritas na Tabela 3. Uma unidade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para a liberação de 1 μmol de glicose por minuto sob as condições experimentais.

Tabela 3. Atividades celulolíticas determinadas para linhagens fúngicas isoladas do solo do Campus II da Unifesspa.

Linhagem	Atividade FPase ($U.mL^{-1}$)	Atividade FPase ($U.g^{-1}$)
A1C2-02	0,02	0,2
A1C2-03	0,05	0,5
A1C2-05	0,06	0,6
A1C2-06	0,06	0,6

A2C2-07	0,01	0,1

Observou-se que as linhagens fúngicas estudadas apresentaram valores de atividade que denotam que as mesmas possuem um bom potencial de estudo para a produção de celulases. Dentre estas, podemos destacar as linhagens A1C2-03, A1C2-05 e A1C2-06, que apresentaram atividades celulolíticas semelhantes e bem promissoras para a continuação da pesquisa, sobretudo na realização de experimentos para determinar as melhores condições de cultivo e reacionais para a obtenção de uma maior atividade. Este potencial pode ser confirmado e afirmado devido ao fato de os valores de atividade celulolítica obtidos neste trabalho são semelhantes aos valores inicialmente obtidos e reportados na literatura (SANTOS, 2017).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi possível perceber que há uma variedade de linhagens fúngicas no solo da área de mata do Campus II da Unifesspa, principalmente porque oito linhagens já foram isoladas e outras estão em processo de isolamento e purificação, e estas linhagens apresentam características morfológicas diferentes umas das outras. Além disso, ao estudar a produção de celulases por algumas destas linhagens (cinco delas foram estudadas), foi possível notar que as linhagens isoladas e cultivadas em meio rico em lignocelulose apresentaram a capacidade de hidrolisar a molécula de celulose contida no papel de filtro. Estes resultados demonstram que essas linhagens são candidatas a serem utilizadas no reaproveitamento dos diversos rejeitos lignocelulósicos gerados na agricultura e no extrativismo da região sudeste do Pará.

REFERÊNCIAS (Conforme ABNT)

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest Aspergillus strains cultivated on agro-industrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization. Industrial Crops and Products, v. 42, p. 236- 242, 2013.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagnt for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G.D.; YOUNESI, H.; LAHIJANI, P.; UZIR, M.H.; MOHAMED, A.R. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 15, p. 4255-4273, 2011.

SANTOS, D.A. Produção de celulases por fungos de ambiente marinho e terrestre para uso na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e produção de 2,3- butanodiol pela bactéria Serratia marcescens a partir de glicose e glicerol. 2017. 222f. Tese (Doutorado em Ciências) – Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

SOUZA, M.F.; SILVA, A.S.; BOM, E.P.S. A novel Trichoderma harzianum strain from the Amazon Forest with high cellulolytic capacity. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 14, p. 183-188, 2018.

TOYAMA, D.; MORAIS, M.A.B.; RAMOS, F.C.; ZANPHORLIN, L.M.; TONOLI, C.C.C.; BALULA, A.F.; MIRANDA, F.P.; ALMEIDA, V.M.; MARANA, S.R.; RULLER, R.; MURAKAMI, M.T.; HENRIQUE-SILVA, F. A novel β-glucosidase isolated from the microbial metagenome of Lake Poraquê (Amazon, Brazil). BBA - Proteins and Proteomics, v. 1866, p. 569-579, 2018.