

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DO SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA, COM O INTERESSE DE PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE GLICOSE OXIDASE. (EC 1.1.3.4)

Thaís Karoline de Souza SILVA¹
João Vicente Braga de SOUZA²
Diego Rayan Teixeira de SOUZA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador CSAS/INPA; ³Co-Orientador CSAS/INPA

INTRODUÇÃO

Na Amazônia, pouco se conhece sobre os fungos, não existindo ainda uma lista com citação de todas as espécies já descritas, o que impossibilita a informação de dados quantitativos, referentes à diversidade desse grupo na região (Sotão *et al.* 2004). Os fungos carregam um poderoso arsenal enzimático, que carregado para fora das hifas fúngicas, irá se associar aos mais diversos substratos orgânicos, quebrando as macromoléculas que compõem esse material orgânico, transformando-as em substâncias mais simples (nutrientes), as quais penetram nas células fúngicas por osmose ou por mecanismos de transporte especializados (Sotão *et al.* 2004). Essa capacidade dos fungos é explorada hoje em dia em vários processos industriais, dentre eles, na produção de enzimas (Nagel *et al.* 2002). O solo da floresta Amazônica, assim como outros solos, são habitats pouco explorados e com grande possibilidade de se isolar novas espécies microbianas, para utilização em processos biotecnológicos (Borneman e Triplett 1997). Particularmente os fungos filamentosos são os mais interessantes devido a sua capacidade de produção de uma ampla gama de enzimas em grandes quantidades (Liping 2004). Dentre as enzimas microbianas temos a glicose oxidase que possui diversas aplicações, especialmente na indústria de alimentos e farmacêuticas é muito utilizada em panificações, produção de vinhos, produtos de higiene bucal além de biomarcadores enzimáticos, onde a mesma tem como fonte de produção os fungos, obtida principalmente a partir do *Aspergillus niger* e *Penicillium spp.* (Jerzy *et al.* 1988). O presente trabalho consistiu em isolar e identificar fungos de solo da floresta Amazônica com interesse de produção extracelular de glicose oxidase, além de descrever a frequência e sazonalidade dos fungos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

As amostras de solo foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus, estado Amazonas. Situam-se entre os paralelos de latitude 03°00' 00 "e 03°08'00" S e longitude 59°52'40 "e 59°58'00" W. A primeira coleta foi no período de chuva onde foram coletadas cinco amostras de solo, as mesmas foram retiradas de uma porção superficial de 0-10 centímetros com uma distância de 100m. A segunda coleta foi no período de seca onde também foram coletadas cinco amostras de solo sendo retirada a mesma porção superficial. Em seguida as amostras foram levadas para o laboratório onde foram processadas e armazenadas.

Isolamento

Isolamento se fez com a utilização de (1g) de solo, onde foram submetidas à técnica de diluições sucessivas, em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada colocou-se um grama da amostra do solo coletado, em seguida foi agitado no vortex e transferido 1mL da primeira diluição contendo água destilada com o solo para o tubo de ensaio (10^{-2}) e assim sucessivamente até a diluição (10^{-5}). As amostras foram plaqueadas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), o processo foi realizado em duplicada. De cada diluição foi retirada 100 µl e transferido para a superfície do meio, sendo espalhando-o com a alça drigalski. Logo após as placas foram acondicionadas na estufa num período de 14 dias (25 °C), sendo avaliada a obtenção de isolados a cada 24 horas. As colônias obtidas foram purificadas por estria de desgaste, cultivo monospórico e submetidas à identificação.

Identificação

A identificação foi realizada segundo Watanabe (2002) e Barnett e Barry (1972) onde foi feita a observação macroscópica das colônias (cor, textura, pigmentação, rugosidade) e também suas características microscópicas. Em seguida foi realizado microcultivo em lâmina técnica de Ridell (1950), sendo possível visualizar as estruturas fúngicas de reprodução, como as hifas, os conídios e os esporos, o que garante uma melhor identificação das linhagens isoladas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram obtidas na Reserva Florestal Adolpho Ducke onde foram feitas duas coletas com estações diferentes. A primeira coleta obteve 34 isolados (tabela 1) estação chuvosa e a segunda coleta 66 isolados (tabela 2) estação quente e úmido obtendo um total de 100 fungos isolados. Os mesmo encontram-se conservados de três formas distintas: óleo mineral, hidropreservação e criopreservação.

Tabela 1. Identificação dos fungos do solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke na estação de chuva.

Amostras	Gêneros identificados	Isolados
01	<i>Aspergillus spp.</i>	11
02	<i>Penicillium spp.</i>	11
03	<i>Trichoderma spp.</i>	8
04	<i>Fusarium spp.</i>	2
05	<i>Acremonium spp.</i>	1
06	<i>Rhodotorula spp.</i>	1
		Total: 34

Tabela 2. Identificação dos fungos do solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke na estação quente e úmida.

Amostras	Gêneros identificados	Isolados
01	<i>Aspergillus spp.</i>	30
02	<i>Penicillium spp.</i>	22
03	<i>Trichoderma spp.</i>	5
04	<i>Fusarium spp.</i>	1
05	<i>Oidiodendron spp.</i>	3
06	<i>Rhodotorula spp.</i>	1
07	<i>Paecilomyces spp.</i>	4
		Total: 66

Feita a comparação da estação quente e úmida onde foram isolados 66, com a da estação chuvosa que foram isolados 34, a escolha de estações diferentes contribuiu para elevar a diversidade de fungos identificados. O número de isolados se alterou de uma época pra outra. A segunda coleta se diferenciou da primeira coleta com aparecimento de duas espécies diferentes como do gênero *Oidiodendron spp* e *Paecilomyces spp.* e a primeira coleta se diferenciou com a presença do gênero *Acremonium spp.* As espécies que se manteve frequentes nas duas coletas foram dos gêneros *Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.*

Domsch *et al.* (1993) afirma que a maioria das espécies que foram encontradas neste trabalho são referidas como isoladas do solo.

Junior e Pereira (2007) afirmam que os gêneros mais frequentemente isolados do solo são: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Arpergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Verticillium*. O que foi possível confirmar com o isolamento de quatro desses gêneros sendo eles: *Arpergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

Segundo Crueger (1990) é notório o crescimento e produção de glicose oxidase nas linhagens de *Penicillium spp* e *Aspergillus spp.* que foram as espécies que mais se predominaram nas duas coletas

CONCLUSÃO

Foi possível observar que em duas coletas obtiveram-se gêneros variados, porém as linhagens mais frequentes foram *Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.* nas duas estações. E já na análise da sazonalidade foi obtido 6 gêneros diferentes na estação chuvosa com 34 isolados e na estação quente e úmida 7 gêneros diferentes com 66 isolados.

REFERÊNCIAS

- Borneman, J. E.; Tripleti, E.W. 1997. Molecular microbial diversity in soil from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7): 2647-2653.
- Crueger, A.; Crueger, W. 1990. Glucose-transforming enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CE (eds). *Microbial enzymes and biotech-nology*, 2nd edn. Elsevier, London, New York, pp 177-227.
- Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.H. 1993. *Compendium of soil fungi*. v.I. San Francisco, Academic Press.
- Jerzy, et al. 1988. *Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of Aspergillus niger G-13 mutant*. Department of Biochemistry and Department of Applied Microbiology, Maria Curie-Sklodowska University, Maria Curie-Sklodowska Square 3, Lublin, Poland.
- Júnior, F.M.R.S.; Pereira, S.V. 2007. Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo. *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 903-905.
- Lacaz, C.L. 1998. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier.
- Liping, W. et al. 2004. *Bioprocessing strategies to improve heterologous protein roduction in filamentous fungal fermentations*. Department of Chemical Engineering, Ohio University, Athens, OH 45701, USA.
- Nagel, F.J.I. 2002. *Process Control of Solid-State Fermentation, simultaneous control of temperature and moisture content*. PhD (Thesis) - University of Wageningen, Wageningen.
- Sotão, H.M.P.; Campos, E.L.; Costa, S.P.S.E. 2004. *Micologia. Diversidade dos fungos na Amazônia*. Sér. Cad. Alf. Cient.Vol. I.