

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE FUNGOS DA REGIÃO DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU – PARANÁ

MEDEIROS, William Bartolomeu

Estudante do curso de Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade. ILACVN –

UNILA

william.medeiros@aluno.unila.edu.br

BONUGLI-SANTOS, Rafaella Costa

Docente do curso de Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade. ILACVN –

UNILA

rafaella.santos@unila.edu.br

1 Introdução

No estudo da diversidade estrutural e funcional de fungos do solo com potencial para a degradação vegetal a atividade de enzimas têm sido cada vez mais usada como marcadores funcionais. Além de marcadores a tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores na síntese de compostos biocatalíticos de alto valor agregado. Neste sentido, enzimas fúngicas vêm ganhando destaque e dentre a gama de enzimas, a lacase, uma enzima do grupo das ligninolíticas, ganha destaque por apresentar diversas aplicações biotecnológicas e é uma das principais enzimas envolvidas na degradação da lignina, segundo componente mais abundante no material vegetal em decomposição (Baldrian, 2006).

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) no estado do Paraná tem sido alvo de trabalhos de pesquisas há vários anos, sobretudo de conservação ambiental. No entanto, trabalhos sobre a microbiota do solo e sua importância ecológica são escassos na literatura ou mesmo inexistentes. Além disto, por conta da grande presença de ferro e outros minerais nos solos do PNI (Schobbenhaus *et al*, 2002), o estudo de sua microbiota merece destaque. Pode-se esperar, por exemplo, que enzimas fúngicas possam possivelmente apresentar alguma adaptação natural proporcionando vantagens biotecnológicas em relação a enzimas de microorganismos já descritos. Neste cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de enzima ligninolíticas de fungos isolados do solo do PNI visando o conhecimento

da atividade funcional e o impacto do estado de conservação do ambiente frente a atividade. Em adição, a seleção de fungos com atividade enzimática permitirá avaliações futuras de possíveis aplicações biotecnológicas.

2 Metodologia

Amostras – Os fungos foram isolados e preservados no laboratório de Biologia da UNILA no projeto PIBIC 2015/2016: “Aislamiento e Identificación de Hongos de da región del Parque Nacional de Iguazú – Paraná” pela discente Samantha Beatriz E. Naranjo, em dois pontos do PNI: 1. Área em recuperação ambiental a mais de 10 anos (25°36’21” S 54°24’43” O) e; 2. Área antropologicamente impactada (25°37’17” S 54°26’46” O). Os 21 fungos, 10 do ponto 1 e 11 do ponto 2 foram reativados em seus respectivos meios de cultivo (BDA – Batata dextrose Agar e MA2 – Extrato de Malte 2%) com a adição de 4mM do reativo Guaiacol.

Cultivo e obtenção dos extratos enzimáticos - Os fungos foram crescidos em 25 ml dos meios líquidos MA2 e BDA (com e sem adição de Guaiacol 4mM) à 28°C e 150 RPM, em duplicata. Após o tempo de incubação o meio foi filtrado em papel filtro a fim de separar o micélio do extrato enzimático.

Crescimento micelial – Após o cultivo em meio líquido o micélio foi utilizado para avaliação do crescimento. O micélio foi seco em estufa por 24h a uma temperatura de 100 °C até peso constante. A massa micelial foi calculada através do peso final menos o peso inicial.

Seleção de fungos com atividade ligninolítica- A solução de ágar base (20 g/L) e 4mM de Guaiacol em placas de Petri estéreis contendo poços de aproximadamente 0,5 mm no ágar, mantendo o fundo da placa coberto com o agar, foram utilizados na seleção. Nos poços foram adicionados 100 uL do extrato enzimático de cada isolado em duplicata, as placas foram incubadas à 37 °C por 24h. Um halo de cor marrom ao redor do poço indica atividade de enzimas ligninolíticas. Os dados foram analisados utilizando-se o software BioEstat 5.3.

3 Fundamentação teórica

No solo o material orgânico oriundo de tecido vegetal em decomposição contém grandes concentrações de lignina, celulose e hemicelulose. A lignina apresenta uma complexa e estável estrutura que torna este material indisponível para a maioria dos organismos. Os fungos desempenham importante papel ecológico pois são capazes de degradarem lignina através da secreção de enzimas coletivamente denominadas “ligninases” ou “enzimas

ligninolíticas” (Dashtban *et al*, 2010). Lacase é uma das principais enzima que degradam a lignina e frequentemente é referenciada como multi-cobre oxidase devido à molécula de cobre (Cu) no centro catalítico (Baldrian, 2006). A lacase catalisa a oxidação de diversas substâncias inorgânicas e aromáticas, principalmente fenóis e embora a lacase fúngica seja conhecida há muito tempo (1896), apenas recentemente têm recebido grande atenção nas diversas áreas de estudo da ciência (Dashtban *et al*, 2010). Sua aplicação biotecnológica pode ser utilizada por indústrias farmacêuticas, para degradação de pesticidas e herbicidas e em pré tratamentos de fibras lignocelulósicas na produção de biocombustíveis (Baldrian, 2006; Dashtban *et al*, 2010), concomitantemente como um excelente indicador biológico da atividade de decomposição do material vegetal, em especial da lignina.

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) foi criado em 1939 e tombado pela UNESCO como Patrimônio da Humanidade em 1986 por ser a última grande amostra da Mata Atlântica. O PNI representa uma área de transição entre a Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual e segundo Schobbenhaus *et al* 2002 a região possui dois domínios geotécnicos: domínio das efusivas vulcânicas e domínio das coberturas recentes. Este primeiro compreende os litótipos vulcânicos basálticos e, de modo restrito, as efusivas ácidas intermediária que ocupam praticamente toda a área do PNI e origina os solos argilosos e ferralíticos (Schobbenhaus *et al*, 2002). Assim, o solo no PNI apresenta características únicas quanto à composição mineral, como presença significativa de ferro.

4 Resultados

Dos 21 fungos isolados, 16 foram avaliados quanto à atividade ligninolítica (10 isolados crescidos em BDA e seis em MA2). Apenas os fungos 1BB.1G e 1BB.2G do meio de cultivo BDA e isolados da região em recuperação ambiental a mais de 10 anos apresentaram atividade ligninolítica na seleção. Foi utilizado para a seleção o reagente Guaiacol, um complexo fenólico sintético semelhante estruturalmente a lignina e eficiente na seleção principalmente de lacase (Bonugli-Santos *et al.*, 2012).

A massa micelial dos isolados crescidos nos tratamentos contendo Guaiacol, como indutor para atividade enzimática, mostraram uma diferença estatisticamente significativa comparados com o controle (sem guaiacol). Foram observados valores de $p < 0,05$ para o teste de normalidade Shapiro-Wilk, portanto foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados, apresentando valores de $p < 0,05$. Deste modo, a adição do Guaiacol revelou impacto negativo ao crescimento dos isolados comparados ao controle. Contudo, apenas o tratamento com adição de Guaiacol apresentou atividade ligninolítica na

seleção. Os meios utilizados para isolamento não mostraram diferenças estatisticamente significativas tanto para isolamento quanto para o crescimento micelial dos isolados, os valores encontrados utilizando o teste T- student para amostras independentes foi $p > 0,05$.

5 Conclusões

Os resultados obtidos até o momento evidenciam o potencial dos fungos do solo do PNI para produção de enzimas ligninolíticas especificamente na região em recuperação ambiental a mais de 10 anos, indicando possível correlação entre a quantidade e característica do material em decomposição deste ponto. Neste sentido, como a degradação do material vegetal é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo a condição física do solo, climáticas, a quantidade e a natureza bioquímica do material em decomposição, a caracterização dos pontos de coleta em relação à diversidade vegetal e fúngica, a ser realizada pelo grupo de pesquisa, permitirá uma maior discussão deste levantamento. O indutor Guaiacol demonstrou ser fundamental para presença de atividade da enzima, provavelmente devido ao mecanismo de regulação gênica amplamente conhecida na literatura. Os isolados positivos serão avaliados quanto à atividade específica da lacase e o efeito de variáveis bióticas e abióticas, bem como determinar a proporção ideal do indutor afim de não alterar o crescimento micelial de forma negativa. Por fim, os isolados positivos serão avaliados visando também o estudo de diversas aplicações biotecnológicas.

6 Principais referências bibliográficas

- BALDRIAN, P. **Fungal laccases – occurrence and properties.** Laboratory of Biochemistry of Wood-Rotting Fungi. Institute of Microbiology ASCR. Prague, Czech Republic, 2005.
- DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignina. *Int. J Biochem Mol. Biol* 1(1) 36-50, 2010.
- SCHOBENHAUS, C. **Parque Nacional do Iguazu, PR Cataratas de fama mundial.** Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos – SIGEP 11. Vol 2, 2002.
- SILVA, R. R & COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Instituto de Botânica – Ibr. Curso de capacitação de monitores e educadores. São Paulo, 2006.
- BONUCCI-SANTOS, R. C. *et al.* **The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents.** *Water, Air, and Soil Pollution* 223, 2012.