

GISELLE MARIA MACIEL

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO BRANCA
DA MADEIRA**

**Campo Mourão
Julho – 2010**

1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção de fungos da podridão branca pode permitir a localização de espécimes com grande capacidade enzimática para as mais diversas aplicações, além de possibilitar a descoberta de novas espécies com recursos bioquímicos de interesse comercial. Nos últimos anos, os fungos da podridão branca (FPB) têm sido aplicados inclusive em estratégias de biorremediação devido à sua capacidade em mineralizar uma grande variedade de compostos altamente tóxicos encontrados no meio ambiente, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas, entre outros (CLEMENTE, 2002; NEVES, 2002).

Existem inúmeras espécies de fungos da podridão branca (FPB), sendo a maioria destas Basidiomycotina, seguidas por algumas Ascomycotina (ERIKSON et al., 1990). No grupo dos basidiomicetos lignocelulolíticos encontram-se organismos que atuam como importantes decompositores, sendo os principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam os componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina a partir dos quais obtém energia para seu crescimento e reprodução. Esses microrganismos são os únicos conhecidos com a capacidade de metabolizar completamente a molécula de lignina a gás carbônico e água, sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (KIRK e FARREL, 1987).

A degradação da lignina por fungos da podridão branca é mais rápida do que a causada por outros microrganismos, sendo estes os responsáveis pela maioria da decomposição da lignina na natureza (KIRK e FARREL, 1987; TUOMELA et al., 2000). Sendo a degradação da lignina um processo complexo, as enzimas produzidas possuem, provavelmente, efeito sinérgico entre si (TUOMELA et al., 2000). Para penetração nas plantas, os fungos geralmente são capazes de secretar enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases), proteolíticas e ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) (KNOGGE, 1996; TUOMELA et al., 2000), as quais podem apresentar características potenciais para aplicação em diversos processos. Recentemente, tem havido um crescente interesse em estudar as enzimas ligninolíticas de uma ampla variedade de fungos de podridão branca, não só do

ponto de vista da biologia comparativa, mas também com a expectativa de encontrar melhores sistemas de degradação da lignina para uso em várias aplicações biotecnológicas (ROCA et al., 2009).

2. OBJETIVO PRINCIPAL

Realizar uma bioprospecção de fungos causadores da podridão branca em madeiras a fim de avaliar características enzimáticas e degradativas potenciais.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e isolar fungos basidiomicetos da madeira.
- Avaliar as taxas de crescimento microbiano em diferentes meios de cultivo.
- Selecionar os fungos isolados quanto ao potencial de produção de enzimas oxidativas e hidrolíticas e de aplicação em processos de biorremediação de corantes industriais e herbicidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta, isolamento e cultivo dos fungos basidiomicetos

Amostras de basidiocarpos e micélio em madeira em decomposição foram coletadas no Parque Estadual do Lago Azul (Campo Mourão, PR) e transportadas até o laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos (UEM), onde foi realizado o isolamento para obtenção de culturas axênicas dos fungos. Fragmentos do tecido interno dos basidiocarpos foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio ágar batata dextrosado (PDA) previamente esterilizado à 121°C por 15 minutos e suplementado com 1 mL de tetraciclina 0,1% (previamente esterilizado em membrana Millipore 0,45µm).

As placas de Petri foram mantidas em estufa à 25°C até observação de crescimento micelial, quando as culturas foram sucessivamente repicadas até

obtenção de culturas axênicas. As culturas puras foram mantidas em placas de Petri em meio Ágar Extrato de Malte (AEM) e também preservadas como “plugs” de ágar em água destilada (CASTELLANI, 1967) por até 6 meses sob refrigeração (4°C).

3.2. Seleção das linhagens quanto ao potencial para aplicação em processos de biorremediação

As linhagens isoladas foram selecionadas em placas contendo meio sólido quanto à capacidade de degradação de corantes industriais, produção enzimática e tolerância à herbicidas e comparadas com a cepa referência *Phanerochaete chrysosporium*.

3.2.1. Crescimento, tolerância e degradação de corantes industriais

As medidas do crescimento micelial na presença de corantes e avaliação da formação do halo de degradação foram realizados em placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio AEM e diferentes tipos de corantes na concentração de 0,05%. Os corantes utilizados foram: Vermelho Fenol, Remazol Brilliant Blue R (RBBR) e Poly R-478. Um “plug” de ágar (16 mm) da linhagem cultivada por 5 dias em AEM foi utilizado como inóculo, e as placas foram incubadas à 28°C por 7 dias. O crescimento micelial foi medido a cada 24 horas (mm/dia) a partir extremidade do inóculo, sendo realizadas duas medidas perpendiculares do micélio (extensão radial) (Levin et al., 2004). Amostras das placas cultivadas em Poly R-478 (composto modelo para avaliação de atividade ligninolítica geral devido à similaridade com a lignina) foram obtidas para determinação da atividade de lacase, segundo a metodologia de ZHAO et al. (1996).

3.2.2. Avaliação do potencial enzimático

A avaliação da capacidade de produção de fenoloxidasas (lacase) e de enzimas hidrolíticas (xilanase e celulase) foi realizada em meio ágar sólido em placas de Petri através da visualização de halos em meios específicos

compostos por: (a) Guaiacol 0,2% e bagaço de cana 0,01% (CGA) (lacase), (b) Ácido tânico 0,5% e extrato de malte 1,5% (fenoloxidas-lacase), (c) RBBxylan 0,05% e extrato de levedura 0,67% (xilanase) e (d) Carboximetilcelulose 0,2%, peptona 0,02% e sais minerais (celulase), segundo as metodologias de OKINO et al. (2000), KOKER et al. (2000), BASARAN et al. (2000) e KASANA et al. (2008).

3.3.3. Tolerância à herbicidas

A tolerância das linhagens aos herbicidas glifosato (N-(phosphonomethyl)glycine) e 2,4-D ((2,4-dichlorophenoxy)acetic acid) foi avaliada através de medidas perpendiculares do crescimento micelial a cada 24 horas (mm/dia). As soluções diluídas dos herbicidas foram preparadas em água destilada e esterilizadas por filtração em membrana Millipore de 45 μ m. Os testes de tolerância foram realizados em meio AEM (2%) (autoclavado separadamente) ao qual foram adicionadas as soluções dos herbicidas para se obter uma concentração final de 40 μ mol/L. As placas contendo o meio adicionado de herbicidas foram inoculadas com um plug de ágar contendo o micélio do fungo (cultivado previamente por 5 dias em meio AEM) e incubadas à 28°C por 7 dias. Placas controle contendo o microrganismo cultivado na ausência do herbicida foram utilizadas para cálculo de inibição (%).

3.3.4. Atividade de lacase

A atividade da lacase foi medida espectrofotometricamente à 420 nm pela oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6 sulphonate)) (EGGERT et al., 1996). A atividade enzimática dos testes de seleção (placas ágar-corantes) foi expressa como U/g de meio ágar.

4. RESULTADOS

Foram coletados 15 fungos basidiomicetos a partir de madeira em decomposição no Parque Estadual do Lago Azul, no entanto, somente uma linhagem foi isolada com sucesso em laboratório. Geralmente houve a associação do crescimento dos basidiomicetos em placa com fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, dificultando a obtenção de culturas puras. A linhagem isolada foi denominada A6 e ainda não foi identificada, no entanto mostrou-se ser uma potencial produtora de lacase (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da capacidade de descoloração de corantes industriais e produção enzimática

Linhagem	CGA	BAV	RBBx	CMC	PR-478	Lacase (IU/g agar)	RBBR	Vermelho Fenol
A6	+	+	-	-	-	0,631	-	+
<i>P. chrysosporium</i>	+	-	-	+	+	0,012	+	+

Os sinais + ou - representam a presença ou ausência de halos de oxidação, degradação ou descoloração.

CGA = meio contendo guaiacol e bagaço de cana; BAV = meio com ácido tânico; RBBx = meio para detecção de atividade xilanólítica; CMC = meio para detecção de atividade celulolítica; PR-478 = corante polimérico Poly R-478; RBBR = corante Remazol Brilliant Blue.

A atividade de lacase (IU/g) foi determinada após cultivo em Poly R-478.

O crescimento de A6 em meio CGA (5,2 mm/dia) foi mais lento que o obtido pela linhagem referência (18,6 mm/dia), no entanto o halo de oxidação do guaiacol iniciou-se após 24 horas para A6, aparecendo somente após 96 horas no cultivo com a cepa referência. A linhagem isolada A6 não descoloriu os corantes testados nas concentrações e condições estudadas. Interessantemente, não houve relação entre a produção de lacase e degradação do corante Poly R-478. A linhagem de *P. chrysosporium* utilizada como referência não é uma boa produtora de lacase, mas possivelmente produz MnP ou LiP, enzimas que podem ser as principais responsáveis pela degradação do Poly R-478 e RBBR neste trabalho. O meio BAV mostrou ser útil na seleção de microrganismos produtores de lacase.

Nos estudos de tolerância à herbicidas, a linhagem A6 mostrou-se inferior à *P. chrysosporium* mostrando taxas de crescimento mais lentas e maiores inibições (resultado comparativo do crescimento na presença e

ausência dos herbicidas). Os resultados de tolerância aos herbicidas glifosato e 2,4-D podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Tolerância ao Glifosato e ao 2,4-D por linhagens de fungos da podridão branca

Linhagem	Crescimento na presença de Glifosato (mm/dia)	Crescimento na presença de 2,4-D (mm/dia)	Inibição pelo Glifosato (%)	Inibição pelo 2,4-D (%)
A6	6,01	6,60	26,89	19,71
<i>P. chrysosporium</i>	31,88	32	1,16	0

Em geral (testes com corantes e herbicidas), o crescimento da linhagem isolada foi mais lento que o da linhagem referência *Phanerochaete chrysosporium*, o que pode dificultar a aplicação de A6 em processos de biorremediação, visto que o crescimento micelial e a capacidade tolerar xenobióticos são características de grande importância. No entanto, A6 mostrou-se ser uma cepa promissora para produção de lacase e, portanto, a aplicação potencial desta nova linhagem pode ser direcionada à produção de lacases que possuem aplicações biotecnológicas nos mais diversos setores industriais.

REFERÊNCIAS

- BASARAN, P., BASARAN, N., HANG, Y.D. 2000. Isolation and characterization of *Pichia stipitis* mutants with enhanced xylanase activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16:545-550.
- CASTELLANI, A. 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42,181-184.
- CLEMENTE, A.R. 2002. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Fungos. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.
- EGGERT, C., TEMP, U., ERIKSSON, K. E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol*, 62:1151–1158.
- ERIKSSON, K.E.L., BLANCHETTE, R.A. AND ANDER, P. 1990. *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Springer Verlag, Germany – Berlin. 407p.
- GUGLIOTTA, A.M. 2001. Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes na indústria têxtil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HAMMOND-KOSACK, K. AND JONES, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. In: Buchanan, B., Gruissen, W., Jones, R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, p. 1102-1155.
- KASANA, R. C., SALWAN, R., DHAR, H., DUTT, S., GULATI, A. 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol* 57:503–507
- KIRK, T.K., FARREL, R. 1987. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41, 465-505.
- KNOGGE, W. 1996. Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, 8, 1711-1722.
- KOKER, T. H., ZHAO, J., ALLSOP, S. F., JANSE B. J. H. 2000. Isolation and enzymic characterization of South African white-rot fungi. *Mycological Research* 104: 820-824.
- Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J., Leung, H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39, 187-224.
- LEVIN, L., PAPINUTTI, L., FORCHIASSIN, F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* 94, 169–176.
- NEVES, E.B. 2002. Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Bactérias. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.
- OKINO, L.K., MACHADO, K.M.G., FABRIS, C., BONONI, V.L.R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 889-893.
- ROCA, E., D'ERRICO, E., IZZO, A., STRUMIA, S., ESPOSITO, A., FIORENTINO, A. 2009. In vitro saprotrophic basidiomycetes tolerance to pendimethalin. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 182–186.

- TUOMELA, M., HATAKKA, A., RAISKILA, S., VIKMAN, M., ITÄVAARA, M. 2001. Biodegradation of radiolabelled synthetic lignin (¹⁴C-DHP) and mechanical pulp in a compost environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 492 – 499.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., ITÄVAARA, M. 2000. Biodegradation of lignin in compost environment: a review. *Bioresour. Technol.*, 169-183.
- ZHAO, J., DE KOKER, T., JANSE, B. J. H. 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiol. Lett.* 143, 393–399.