

**Anais da XV Jornada
de Iniciação Científica da
Embrapa Amazônia Ocidental**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da XV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Everton Rabelo Cordeiro
Eduardo Ossamu Nagao
Inocencio Junior de Oliveira
Jony Koji Dairiki
Maria Geralda de Souza
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Editores Técnicos*

Embrapa
Brasília, DF
2019

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, Km 29,
Estrada Manaus/Itacoatiara,
Manaus, AM
69010-970

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Unidade responsável pelo
conteúdo e edição**

Embrapa Amazônia Ocidental

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cheila de Lima Boijink*

Secretária-executiva: *Gleise Maria*

Teles de Oliveira

Membros: *Maria Augusta Abtibol Brito
de Sousa, Maria Perpétua Beleza Pereira
e Marcos Vinícius Bastos Garcia*

Revisão de texto

Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica

Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa
(CRB 11/420)

Capa, projeto gráfico e editoração
eletrônica

Gleise Maria Teles de Oliveira

1ª edição

Publicação digital (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Embrapa Amazônia Ocidental.

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (14. : 2018: Manaus, AM).
Anais da XV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental; editores,
Everton Rabelo Cordeiro... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PDF (143 p.).

ISBN 978-85-7035-948-3

1. Iniciação científica. 2. Comunicação científica. 3. Pesquisa. I. Cordeiro, Everton Rabelo. II. Nagao, Eduardo Ossamu. III. Oliveira, Inocencio Junior de. IV. Dairiki, Jony Koji. V. Souza, Maria Geralda de. VI. Morais, Ronaldo Ribeiro de. VII. Título. VIII. Embrapa Amazônia Ocidental.

CDD 630.72

Seleção de fungos de podridão branca degradadores de xenobióticos

Gabriela Batista Bastos¹

Aleksander Westphal Muniz²

José Renato Pereira Cavallazzi³

Resumo – No presente trabalho foi testada a atividade biorremediadora de enzimas lignolíticas produzidas por fungos de podridão branca coletados no campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. Foi analisada a degradação do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) e constatou-se efetiva descoloração de 88,78% por parte de um dos isolados fúngicos e que a massa total de micélio não interferiu na produção ou ação enzimática.

Termos de indexação: biorremediação, corante, fungos.

¹Bolsista de Iniciação Científica, Pibic/CNPq/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

²Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

³Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Microbiologia Agrícola, professor da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

Selection of white-rot fungi that degrade xenobiotic agents

Abstract – In this research, it was tested the bioremediation activity of ligninolytic enzymes produced by white rot fungi collected from Federal University of Amazonas, in Manaus. It was analyzed the degradation of Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and the results showed that it had a 88,78% decolouration by one of the fungus isolated and that the total mass did not interfere with the enzyme production nor it's effectiveness.

Index terms: bioremediation, dye, fungus.

Introdução

Os resíduos coloridos da indústria têxtil são considerados como um dos mais poluentes, por causa de seu grande volume e composição tóxica (Kamida; Durrant, 2005), sendo estes mutagênicos e recalcitrantes (Peixoto et al., 2013). Em razão dessas características, a demanda por processos biorremediadores tem sido grande. Os fungos de podridão branca (FPB) foram apontados como degradadores de substâncias xenobióticas por produzirem enzimas inespecíficas lignolíticas, como a lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) e lacase (EC 1.10.3.2) (Tuomela, 2002), que são capazes de degradar moléculas de fenol, comuns à maioria dessas substâncias. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar FPB degradadores de corantes recalcitrantes.

Material e Métodos

Isolados fúngicos foram coletados, a partir de basidiocarpos estabelecidos em madeira em decomposição, no campus da Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Manaus, AM. Fragmentos dos cogumelos coletados foram preparados assepticamente, imergindo-os em duas soluções de 20 mL de álcool 70% e de 20 mL de hipoclorito de sódio 2%, ambos por 30 segundos, para depois serem lavados e hidratados em água esterilizada. Os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo 20 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados à temperatura ambiente. A manutenção da coleção fúngica foi realizada sempre que necessária, por meio de sucessivas inoculações, e mantida sob refrigeração, para que a qualidade das hifas fosse preservada. Neste estudo, utilizou-se o fungo *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725) como controle, por já terem sido caracterizadas suas enzimas ligninases, que reagem à presença de H₂O₂ (Tien; Kirk, 1984). Também foram utilizados tratamentos abióticos, meios de cultivo contendo corante, mas sem fungos, como controle negativo.

Para a determinação da atividade lignolítica, discos contendo micélio foram inoculados em três réplicas de placas de Petri contendo meio BDA acrescido de indicadores enzimáticos ácido tânico (5 g/L) (PM: 1.701,19 g/mol) e guaiacol (500 ppm) (PM: 124,14 g/mol) e armazenados à temperatura ambiente em estufa durante 10 dias. Em ambos os casos, a presença de halo marrom ou avermelhado ao redor da colônia fúngica, respectivamente, indica a ação oxidante sobre os acrescidos, evidenciando atividade lignolítica. Observaram-se, durante uma semana, a presença ou ausência desses halos e, no caso do ácido tânico, sua intensidade.

Nos experimentos de descoloração, utilizou-se o corante industrial antraquinona Remazol Brilliant Blue R (RBBR; PM 626,54 g/mol) (50 mg/L), $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,5 g/L) e $CuSO_4$ (0,04 g/L) em todos os experimentos nessa etapa do trabalho. Na descoloração em meio sólido, discos contendo micélio fúngico foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA acrescido da solução de corante. As culturas foram incubadas em estufa à temperatura ambiente por 10 dias a fim de se observar a presença e intensidade de possível atividade descolorante.

Para a descoloração em meio líquido, foram utilizados pedaços de micélio, que foram inoculados em erlenmeyers contendo 50 mL de solução batata e glicose e solução de corante. Estes foram mantidos à temperatura ambiente por 12 dias. Após o período de incubação, os micélios foram filtrados e transferidos para folhas de alumínio para que fossem realizadas pesagens em balança de precisão, e transferiu-se o conteúdo líquido para tubos Falcon, que foram mantidos sob refrigeração. Análise de descoloração foi realizada com auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 592 nm para RBBR. Os resultados foram expressos em porcentagem para determinar a degradação do corante pelas enzimas lignolíticas presentes.

Neste estudo, como análise estatística, foi utilizado o teste de Scott-Knott (1974), para comparar a influência da massa total dos micélios obtidos com a produção enzimática.

Resultados

Após 7 dias de cultivo, foi possível registrar a presença ou ausência de halo produzido em meios acrescidos de indicadores enzimáticos (Tabela 1).

Tabela 1. Registro de presença de halo enzimático em meio de cultura acrescido de indicadores de enzimas lignolíticas produzido por fungos de podridão branca.

Isolados fúngicos	Indicadores enzimáticos		
	Ácido tânico		Guaiacol Reação
	Reação	Intensidade do halo	
28	+	***	+
31	-	-	-
33	-	-	-
34	+	**	+
35	+	***	+
46	+	***	+
47	+	***	+
49	+	***	-
51	-	-	-
52	+	***	+
53	+	***	-
PC	-	-	+

Legenda: **Atividade enzimática:** (+): reação positiva, presença de halo enzimático; (-): reação negativa, ausência de halo enzimático; **Intensidade da atividade enzimática:** (*): halo enzimático de cor amarelo-clara; (**): cor castanho-clara; (***): cor castanho-escura. Todos os isolados com atividade positiva para guaiacol apresentaram coloração uniforme vermelha, característica do composto sob oxidação.

Atividade de descoloração observável em meio de cultivo sólido acrescido de RBBR (período de cultivo de 10 dias) também foi registrada (Tabela 2).

Para os ensaios de descoloração em meio líquido foram registradas a média de absorvância para cada isolado e a porcentagem de descoloração (Tabela 3). A Figura 1 mostra os diferentes níveis de degradação realizados pelos isolados.

Tabela 2. Registro visual de descoloração de meio de cultura acrescido de corante RBBR por fungos de podridão branca.

Descoloração em meio sólido do corante RBBR		
Isolados fúngicos	Reação	Intensidade
28	-	-
31	+	***
33	-	-
34	+	***
35	-	-
46	-	-
47	-	-
49	-	-
51	+	*
52	-	-
53	-	-
PC	-	-

Legenda: **Atividade enzimática:** (+): reação positiva, atividade descolorante de RBBR; (-): reação negativa, ausência de atividade descolorante; **Intensidade de descoloração:** (*): pouca descoloração observável; (**): descoloração parcial; (***) descoloração por completo do meio sólido.

Tabela 3. Absorbância média do meio exposto às enzimas lignolíticas por 12 dias.

Descoloração em meio líquido do corante RBBR		
Isolados	Abs. média	RBBR degradado (%)
28	0,272	62,80
31	0,491	32,84
33	0,407	44,33
34	0,449	38,58
35	0,531	27,36
36	0,259	64,57
46	0,448	38,72
47	0,318	56,50
49	0,417	42,96
51	0,082	88,79

Tabela 3. Continuação.

Descoloração em meio líquido do corante RBBR		
Isolados	Abs. média	RBBR degradado (%)
52	0,286	60,88
53	0,158	78,39
PC	0,502	31,33
Abiótico	0,731	0

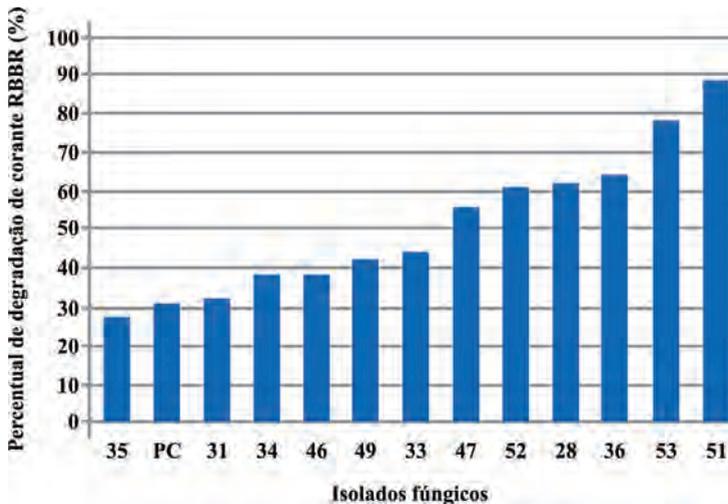


Figura 1. Descoloração de RBBR (%) por isolado fúngico. Uma amostra abiótica (controle negativo) foi utilizada para comparação.

Discussão

Avaliação da presença de halo marrom em meio acrescido de ácido tânico é chamada de teste de Bavendamm, e este é utilizado para identificar oxidação de lignina. Entretanto, alguns fungos, apesar de oxidarem ácido tânico, não realizam degradação de madeira (Davidson et al., 1938); neste estudo, isso ocorre em quatro fungos testados. Entretanto, três inóculos que não reagiram ao ácido tânico apresentaram degradação de corantes, ambas as constatações

em meio sólido. Em contrapartida, o guaiacol apresentou cinco resultados errôneos. Isso ocorre por causa de limitações do próprio reagente na identificação de enzimas ligninocelulolíticas. Já em meio líquido, todos os isolados apresentaram algum tipo de descoloração.

É importante acrescentar que, em protocolo padrão para ensaios de descoloração em meio líquido, o tempo de cultivo e atividade enzimática é de 28 dias. Durante a aferição da absorbância em espectrofotômetro, observou-se que os isolados 51,52,53 e 28 já haviam degradado mais de 60% do corante contido no meio. Portanto, o protocolo foi modificado para 12 dias para que fosse possível registrar o percentual de degradação total das amostras, mas isso demonstra a eficiência dos isolados testados para degradação da substância RBBR. Também não foram encontradas relações entre a massa total de micélio e a produção enzimática.

Conclusões

De acordo com os resultados, conclui-se que os isolados 51 e 53 foram os que degradaram o maior percentual de RBBR, apresentando, assim, maior potencial como agentes biorremediadores. Também é possível apontar que os indicadores enzimáticos não são totalmente precisos na seleção de potenciais oxidantes de lignina; entretanto, entre os dois indicadores utilizados, o guaiacol foi o mais acurado.

Referências

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, fev. 2005.

PEIXOTO, F.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Corantes têxteis: uma revisão. **Holos**, v. 5, p. 1807-1600, 2013.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Science**, v. 221, p. 661-663, 1984.

TUOMELA, M. **Degradation of ligning and toher c-labelled compounds in compost and soil with an emphasis on white-rot fungi**. Helsinki: University of Helsinki, 2002.