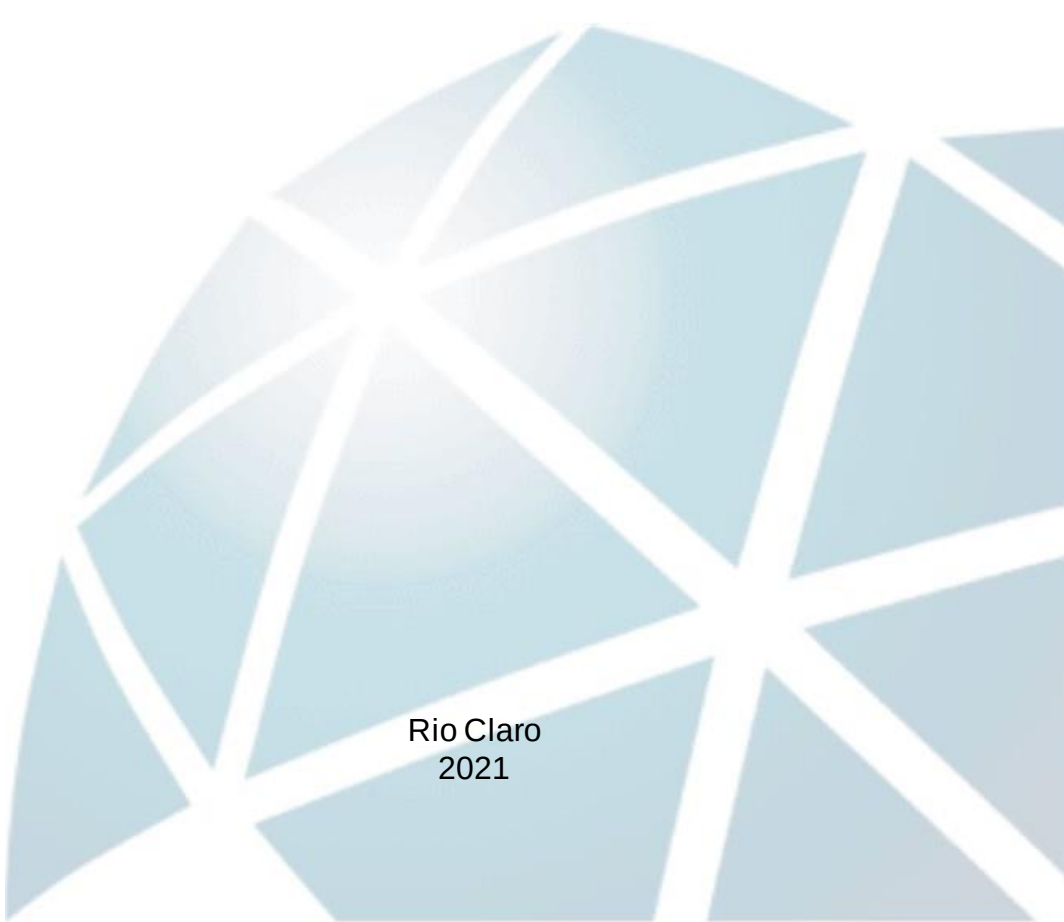

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NOTURNO

JÚLIA LEAL SANCHES

**ISOLAMENTO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS DE
AMOSTRAS DA ANTÁRTICA E SUAS ATIVIDADES
ENZIMÁTICAS**



Rio Claro
2021

JÚLIA LEAL SANCHES

ISOLAMENTO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS DE AMOSTRAS DA
ANTÁRTICA E SUAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Orientador: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Coorientador: Dra. Patrícia Giovanella

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2021

S211i	Sanches, Júlia Leal ISOLAMENTO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS DE AMOSTRAS DA ANTÁRTICA E SUAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS / Júlia Leal Sanches. -- Rio Claro, 2021 30 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Lara Durães Sette Coorientadora: Patrícia Giovanella 1. Fungos Antárticos. 2. enzimas ligninolíticas, Lac, MnP, LiP. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

Por ser um ambiente extremamente restrito, o continente Antártico possui pouca quantidade de nutrientes e longos períodos de escuridão, que limitam o desenvolvimento da vida. Fungos extremófilos que vivem em ambientes como a Antártica são classificados como psicrofílicos ou psicrotolerantes. Estes, possuem mecanismos específicos para a sobrevivência neste tipo de ambiente, incluindo a produção de enzimas adaptadas ao frio, que possuem eficiência catalítica. Os objetivos desse estudo foram isolar fungos provenientes de amostras antárticas e avaliar as atividades das enzimas lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e Lacase (Lac). As enzimas ligninolíticas têm propriedades que podem ser vantajosas para vários setores industriais, entre eles a indústria têxtil e de papel, na produção de biocombustíveis e também na biorremediação de diversos poluentes ambientais, já que são responsáveis pela quebra das estruturas aromáticas e das ligações entre as unidades básicas da lignina. O método de enriquecimento permitiu isolar 31 fungos (15 filamentosos e 16 leveduras). Dentre os fungos filamentosos, 5 se mostraram potenciais produtores de enzimas ligninolíticas a 28 °C (J4C, J4D, J7B, J8C e J8D) e 2 a 15 °C (J8C e J8D). Esses fungos foram provenientes de amostras de sedimento marinho (2), solo (2) e madeira (1). Os resultados do presente trabalho evidenciam a importância da ampliação e manutenção de coleções de culturas microbianas, em especial quando há complexidade e altos custos envolvidos em expedições para coleta de amostras.

Palavras-chave: Fungos Antárticos, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), Lacase (Lac), enzimas ligninolíticas.

ABSTRACT

As an environment extremely restricted, the Antarctic continent has less nutrients and long periods of darkness, limiting the development of life. Extremophilic fungi that live in environments like Antarctica are classified as psychrophilic or psychrotolerant. These have specific mechanisms for survival in this type of environment, including the production of enzymes adapted to the cold, which have catalytic efficiency. The objectives of this study were to isolate fungi from Antarctic samples and to evaluate the activities of the enzymes lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and Lacase (Lac). Ligninolytic enzymes have properties that can be advantageous for various industrial sectors, including the textile and paper industry, in the production of biofuels and also in the bioremediation of various environmental pollutants, since they are responsible for breaking the aromatic structures and the links between the basic units of lignin. The enrichment method allowed to isolate 31 fungi (15 filamentous and 16 yeasts). Among the filamentous fungi, 5 were shown to be potential producers of ligninolytic enzymes at 28 °C (J4C, J4D, J7B, J8C and J8D) and 2 at 15 °C (J8C and J8D). These fungi came from samples of marine sediment (2), soil (2) and wood (1). The results of this work show the importance of expanding and maintaining collections of microbial cultures, especially when there is complexity and high costs involved in expeditions to collect samples.

Key words: Antarctic fungi, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), Lacase (Lac), ligninolytic enzymes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	13
3. METODOLOGIA.....	14
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos realizam um papel relevante na manutenção da estabilidade e equilíbrio da biosfera. Dentre eles destaca-se o Reino Fungi, um grupo com fisiologia, morfologia, genética e distribuição geográfica muito variada (HIBBETT et al., 2011), o que torna sua diversidade muito pouco conhecida (SCHEFFERS et al., 2012). Devido a ampla complexidade e diversidade, algumas espécies são capazes de sobreviver em ambientes extremos (extremófilos), como por exemplo a Antártica. O ambiente antártico é extremamente restrito, com baixa diversidade de formas de vida devido às características que prevalecem no continente, incluindo baixas temperaturas, ventos fortes, elevada incidência de radiação UV, pouca quantidade de nutrientes e longos períodos de escuridão (DUARTE et al., 2018a). Assim, nesse continente os micro-organismos são considerados a base do funcionamento de ecossistemas terrestres e aquáticos (CLARKE, 2003), devido a sua capacidade de transportar energia e matéria orgânica, fazer a ciclagem de compostos orgânicos, sendo fundamentais para o ambiente e de interesse para a comunidade científica (CALDWELL et al., 1998).

Considerando que como consequência do aquecimento global os ecossistemas antárticos estão sendo perturbados (ROYLES et al., 2013), levando à perda de micro-organismos endêmicos e mudanças na biodiversidade, os estudos da biodiversidade e aplicação biotecnológica de micro-organismos que habitam esses ecossistemas devem ser estimulados.

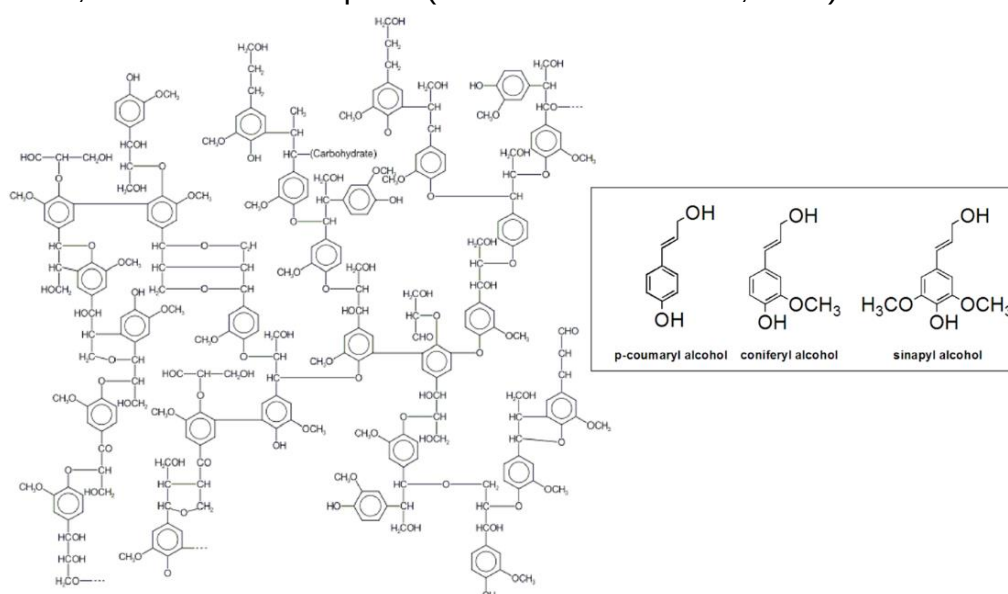
Fungos que habitam os sedimentos marinhos e o solo possuem a função de decompositores, sendo de grande importância para a reciclagem de nutrientes dos ecossistemas Antárticos (MONTROYA et al., 2018). Características como produção de melanina e paredes celulares mais espessas podem ser os principais fatores que permitem a adaptação desses organismos às condições extremas. Estes micro-organismos possuem altas concentrações de lipídios insaturados na membrana, proteínas anticongelantes e enzimas ativas a baixas temperaturas (DUARTE et al., 2018a; SELBMANN et al., 2011).

Os fungos extremófilos da antártica podem ser classificados como psicrófilos, capazes de crescer temperaturas de 0 °C a ≤ 15 °C, com temperatura máxima de crescimento ≤ 20 °C; e psicrotróficos, aqueles que podem crescer de 0 °C com máxima temperatura de crescimento pouco acima de 20 °C (RUISI et al., 2007). Essa tolerância ao frio é importante, pois no ambiente antártico as temperaturas são muito

baixas, podendo chegar a temperaturas abaixo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ no inverno, o que inibe ou dificulta a realização de processos celulares essenciais (BARATO, 2014). A síntese de enzimas adaptadas a baixas temperaturas foi uma maneira que encontraram de contornar esse problema. As enzimas adaptadas ao frio são caracterizadas por sua eficiência catalítica, requerem uma menor energia de ativação, e são estáveis em temperaturas um pouco mais altas que as de seu crescimento habitual, ou seja, estáveis em temperaturas de até $25/28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Isso se deve ao aumento da flexibilidade da molécula da enzima, as quais possuem menor quantidade de pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto em comparação com as produzidas por seus homólogos mesófilos e termófilos (BARATO, 2014). De acordo com Duarte et al. (2018a), as hidrolases e oxidases são as principais enzimas produzidas por fungos de origem Antártica.

As enzimas ligninolíticas pertencem ao grupo das oxirredutases e são responsáveis pela quebra das estruturas aromáticas e das ligações entre as unidades básicas da lignina (figura 1) e por outras funções biodegradativas (WONG, 2009). A lignina é uma molécula encontrada em plantas vasculares, recalcitrante a degradação e com complexa estrutura derivada de monômeros precursores ligninolíticos: os álcoois hidroxicinâmicos p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (WONG, 2009).

Figura 1. Estrutura de uma molécula de lignina e suas moléculas precursoras (álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (CHRISTOPHER et al, 2014).



Dentre as enzimas ligninolíticas destacam-se as lignina peroxidases (LiP) (figura 2), manganês peroxidases (MnP) (figura 3) e as lacases (Lac) (figura 4) (WONG, 2009).

Figura 2. Representação 3D de Lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* (fungo de podridão branca no qual a enzima foi descoberta). UniProtKB - P21764 (LIG3_PHACH).



Figura 3. Representação 3D de Manganês peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* (fungo de podridão branca) -UniProtKB - Q02567 (PEM1_PHACH).

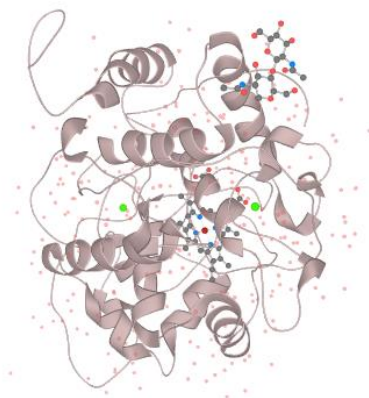
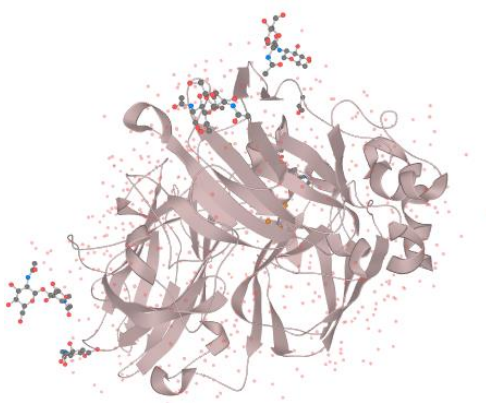


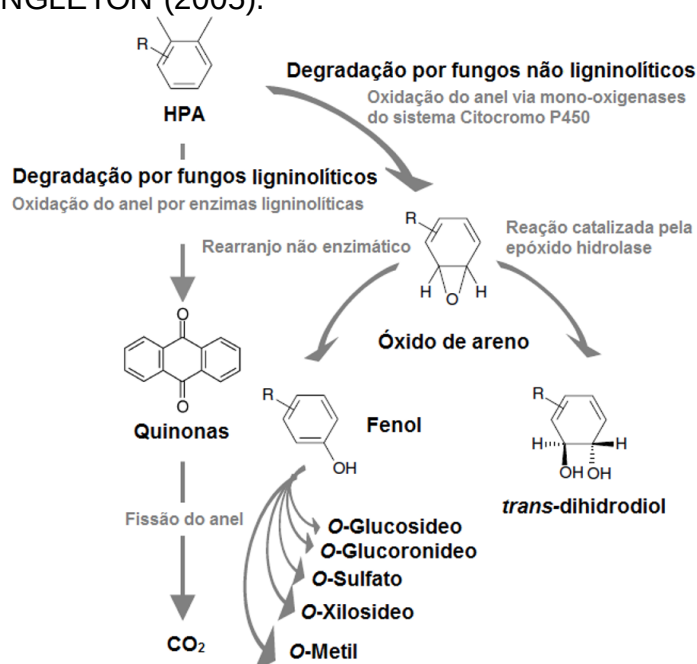
Figura 4. Representação 3D de Lacase de *Trametes versicolor* (fungo de podridão branca) - UniProtKB - Q12718 (LAC2_TRAVE).



As lignina peroxidases (LiP) possuem ampla especificidade quanto a seus substratos, sendo também conhecidas por oxidar substratos aromáticos fenólicos e uma variedade de compostos ligninolíticos não fenólicos. As manganês peroxidases (MnP) pertencem a um grupo de glicoproteínas que oxidam Mn^{2+} a Mn^{3+} , que por sua vez pode oxidar um grande número de substratos fenólicos como fenóis simples, corantes, aminas e dímeros através de rearranjos e clivagens de ligação (ABDEL-HAMID et. Al, 2013). As lacases (Lac) pertencem ao grupo de enzimas multicobre oxidases, as quais catalisam a oxirredução de grupos hidroxila fenólicos de compostos de lignina fenólica, como o guaiacol, de modo a formar radicais fenólicos que irão passar por polimerização via acoplamento radical (WONG, 2008).

As enzimas ligninolíticas têm propriedades térmicas que podem ser relevantes para vários setores industriais como indústria têxtil, no processamento de algodão, na reciclagem de papel, na fabricação de detergentes, fabricação de aditivos para ração animal, na produção de biocombustíveis (DUARTE, 2018^a). Além disso, são capazes de oxidar uma ampla variedade de poluentes ambientais de difícil degradação, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), corantes têxteis e agrotóxicos (SETTE et al., 2008). O mecanismo de degradação de poluentes ambientais como os HPAs por fungos ligninolíticos e não ligninolíticos estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. As duas principais vias de degradação de HPAs por fungos. Adaptado de BAMFORTH & SINGLETON (2005).



Os HPAs são compostos por dois ou mais anéis aromáticos, assemelhando-se estruturalmente com a molécula de lignina, e além de tóxicos, também são poluentes ambientais derivados de fontes pirogênicas e petrogênicas. Os HPAs de alto peso molecular, como benzo[a]pireno e pireno são constituídos por cinco e quatro anéis aromáticos, respectivamente. Quanto mais anéis há em sua estrutura, mais difícil e demorada é a degradação do composto, desse modo esses são classificados pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), como poluentes prioritários, pois possuem propriedades hidrofóbicas e baixa solubilidade em água, tendo alta afinidade para solos ricos em matéria orgânica e sedimentos marinhos (VASCONCELOS et al., 2019).

O uso de enzimas ligninolíticas fúngicas para degradação dos HPAs e corantes têxteis pode ser considerada uma alternativa de biorremediação devido à grande semelhança entre as moléculas aromáticas dos poluentes com a molécula de lignina e a possibilidade de se obter a mineralização do poluente ou sua transformação em produtos menos tóxicos, com maior solubilidade na água e que podem ser ainda mais degradados pela ação de outros micro-organismos (BARATO, 2014).

Neste contexto, as coleções de culturas microbianas, em especial as fúngicas, são de extrema importância, pois realizam o papel de preservar e fornecer os recursos genéticos microbianos e suas informações associadas para a realização de pesquisa e desenvolvimento em diversos setores de importância socioeconômica. Portanto, o conhecimento e prospecção de novos microbiomas tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica (BARATO, 2014).

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo principal isolar fungos com potencial ligninolítico a partir de amostras de solo, madeira e sedimento marinho da Antártica e avaliar a atividade das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase.

2.1. Objetivos específicos

- Isolamento seletivo de fungos a partir de amostras marinhas e terrestres da Antártica;
- Purificação, preservação e catalogação dos isolados utilizando as técnicas de rotina da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP);
- Avaliação qualitativa e quantitativa da produção de enzimas ligninolíticas pelos fungos isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Foram utilizadas amostras de sedimento marinho, solo e madeira (tabela 1) coletadas durante a Operação Antártica realizada em dezembro de 2018 (OPERANTAR XXXVII).

Tabela 1. Dados relacionados ao código, tipo de amostra, local de coleta e localização geográfica.

Código	Tipo de amostra	Local da coleta	GPS (XX°Y.YYY')
J1	Madeira (Telhado)	Whalers bay	62° 58.783' S
		(Ilha Deception)	60° 33.314' W
J2	Sedimento Marinho	Deception	62° 59.071' S
		(Whalers bay)	60° 33.720' W
J3	Solo	Hennequin	62° 07.429' S
			58° 23.697' W
J4	Solo	Ilha Rei George	62° 05.744' S
		Botany point	58° 19.145' W
J5	Solo	Ilha Rei George	62° 05.132' S
		Turret	57° 56.563' W
J6	Solo	Punta Hanna	62° 38.958' S
		(Livingstone)	60° 36.093' W
J7	Madeira (Barco)	Whalers bay	62° 58.783' S
		(Ilha Deception)	60° 33.314' W
J8	Sedimento Marinho	EACF Heliponto	62° 05.168' S
			58° 22.829' W

3.2. Isolamento de fungos com potencial ligninolítico

3.2.1. Preparo das amostras: técnica de enriquecimento

Foram adicionados a Erlenmeyers de 125 mL, 50 mL de meio de cultura MM1 (RICHARD & VOGEL, 1999) composto por solução de macronutrientes (KCl 0,7 g/L, NaH₂PO₄H₂O 2,9 g/L, Na₂HPO₄ 3,0 g/L e (NH₄)₂SO₄ 1,0 g/L) e solução de micronutrientes (1mL/L) (MgSO₄ 4,0 g/L, FeSO₄ 0,2 g/L, MnCl₂ 0,2 g/L e CaCl₂ 0,2 g/L). Ao meio MM1 foram adicionados 0,15 g/L de cloranfenicol e 5 g de serragem como única fonte de carbono antes da autoclavagem. A serragem utilizada era

constituída por pequenas lascas ou pó de madeira adquiridas na serralheria da UNESP – Câmpus de Rio Claro. O meio de cultivo foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Posteriormente, foram adicionados 5 g de cada amostra (solo, madeira ou sedimento) seguido de incubação a 15 °C e 140 rpm. Após 15 dias de incubação foram retirados 5 mL do cultivo e adicionados à novos Erlenmeyers com meio de cultura MM1 + cloranfenicol 0,15 g/L e serragem, totalizando 3 inoculações sucessivas em 45 dias.

3.2.2. Controle de crescimento microbiano

A cada 15 dias de cultivo foram retiradas alíquotas de 50 µL dos enriquecimentos, as quais foram inoculadas em placas de Petri contendo Meio Nutriente Ágar (3 g/L de extrato de carne; 5 g/L de peptona bacteriológica e 15 g/L de ágar bacteriológico enriquecido com 0,15 g/L de cloranfenicol). O meio de cultivo foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos posteriormente incubadas à 15 °C por 48 h para o monitoramento do crescimento microbiano.

3.2.3. Isolamento e purificação

Após o período de enriquecimento (45 dias) foram retiradas alíquotas de 100 µL e foram efetuadas diluições sucessivas, pela técnica da diluição seriada. As diluições que foram diluídas a 100, 10-2 e 10-4 foram inoculadas em placas contendo meio Ágar Malte (MA 2%: 20 g/L de malte e 15 g/L de ágar bacteriológico) acrescido de 0,15 g/L de cloranfenicol. A inoculação foi realizada utilizando a técnica de espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 15 °C por 7 dias. A pureza dos isolados foi avaliada por meio de exames macroscópicos e a viabilidade celular por meio da verificação do desenvolvimento do micélio e da esporulação (fungos filamentosos), e da formação de colônias isoladas (leveduras).

3.3. Produção de enzimas ligninolíticas

3.3.1. Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas: triagem qualitativa

Os isolados foram submetidos a triagem qualitativa em meio B&K sólido, composto por 10 g/L de glicose, 2 g/L de peptona e 1 g/L de extrato de levedura, 0,15 g/L de cloranfenicol, 4 mM de guaiacol e 20 g/L de ágar. Os isolados (fungos filamentosos e leveduriformes) foram inoculados nas placas de Petri contendo meio B&K + Guaiacol

e incubados por 7 dias a 15° C e a 28° C. A presença de coloração marrom ao redor do micélio em meio suplementado com guaiacol indica a formação de guaiacoquinona, o que indica a presença de enzimas ligninolíticas, em especial a lacase (VERMA et al., 2010).

3.3.2. Avaliação da produção das enzimas ligninolíticas: triagem quantitativa

Os fungos que apresentaram a produção de composto de coloração marrom quando cultivados na presença de guaiacol (item 3.3.1) foram cultivados em duplicata em Erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio MA 2%, incubados a 15°C e 28°C por 7 dias a 140 rpm. Os caldos enzimáticos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Para alguns fungos além da centrifugação foi necessário realizar filtração em papel filtro para eliminar micélios/esporos no caldo enzimático final.

Os caldos foram analisados por espectrofotometria UV/VIS quanto à produção quantitativa das enzimas lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) como descrito abaixo.

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U/L⁻¹ do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação derivada da Lei de Beer-Lambert:

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t$$

Onde:

ΔA é a diferença entre a absorbância final e a inicial V

V é o volume da reação (1 mL para Lac e MnP – 2,5 mL para LiP)

10⁶ converte os mols de ε para μmols

ε é o coeficiente de extinção molar (M⁻¹ cm⁻¹)

R é a quantidade de caldo enzimático (L)

T é o tempo de reação (min)

3.3.3.1. Lacase (Lac)

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline (ABTS) na absorbância de 420 nm, e ε = 36000, como descrito por Buswell et al. (1995), onde 300 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 foi adicionado a 600 μL de caldo enzimático e 100 μl de ABTS 0,5 mM. Após a primeira

leitura (T_{zero}), as cubetas foram incubadas a 37 °C por 10 minutos, sendo assim realizada a segunda leitura (T_{final}).

3.3.3.2. Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade enzimática da LiP foi medida através do aumento da absorbância a 310 nm, $\epsilon = 9300$ com a oxidação de álcool veratrílico (VA; 3,4-dimethoxybenzyl alcohol) (BARATO, 2014). A solução foi composta por 1000 μL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 4,5 adicionado a 500 μL de caldo enzimático, 500 μL de álcool veratrílico (10 mM) e 500 μL de peróxido de hidrogênio (2 mM). A leitura foi realizada a 310 nm após a adição de peróxido de hidrogênio (2 mM) na solução incubada por 10 minutos em temperatura ambiente (25 °C).

3.3.3.3. Manganês Peroxidase (MnP)

No caso da MnP, o mecanismo de ação foi avaliado pela oxidação do malonato de sódio a 270 nm e $\epsilon = 11590$. A reação foi composta por 0,8 mL de malonato de sódio (0,05 M), 0,05 mL de sulfato de manganês (0,01 M), 0,1 mL de solução enzimática e 0,05 mL de peróxido de hidrogênio (2 mM), sendo incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período foi feita a leitura a 270 nm.

3.4. Preservação dos isolados

Os fungos filamentosos foram preservados em criotubos por dois métodos distintos: criopreservação e Castellani. A criopreservação consiste em um ultracongelamento a -80 °C dos micélios/espores em glicerol 20%. O método de Castellani é uma preservação em água esterilizada, a 4°C. No caso dos filamentosos, 4 pedaços de ágar+micélio de cada isolado foram preservados em ultracongelamento a -80 °C e Castellani. As leveduras foram preservadas apenas pelo método de criopreservação, um ultracongelamento a -80°C das colônias isoladas em glicerol 20%.

3.4.1. Organização e Catalogação

Os fungos preservados foram organizados sistematicamente (tabela 2) e adicionados ao acervo de fungos da Antártica da coleção de culturas do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), o qual está associado Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). Para cada caixa foi dado um número visando

facilitação da localização de cada isolado preservado. Os registros das posições dos criotubos, bem como das caixas (mapeamento) serão transferidos para o sistema informatizado de gerenciamento do acervo (μSICol) futuramente, pois devido a pandemia de COVID-19 e a paralização das atividades presenciais, não foi possível realizar a identificação taxonômica dos isolados.

4. RESULTADOS

No isolamento pelo método do enriquecimento foi verificado o crescimento fúngico, sendo possível notar a turvação em todas amostras utilizadas. Também se observou a mudança de coloração no meio de cultivo de acordo com o crescimento dos fungos, além da formação de biomassa ao redor do Erlenmeyer no caso dos fungos filamentosos (Figura 6).

Foram isolados 31 fungos a partir das oito amostras provenientes da Antártica, sendo 16 leveduriformes e 15 filamentosos (Tabela 2). Os isolados leveduriformes se adaptaram melhor a temperatura de 15 °C, enquanto os filamentosos a a 28 °C.

Figura 6. Amostras J4C e J8C após 3 etapas (45 dias) de enriquecimento a 15°C e 140 rpm.



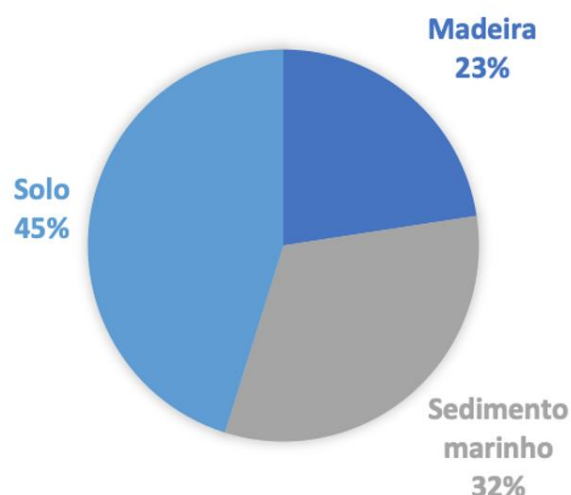
Tabela 2. Isolados filamentosos (em preto) e leveduriformes (verde), código LAMAI e amostra original.

Código original	Código LAMAI	Amostra de origem
J1A	LAMAI 2444	Madeira (Telhado) - Whalers bay (Ilha Deception)
J1B	LAMAI 2445	
J1C	LAMAI 2446	
J2A	LAMAI 2447	Sedimento Marinho - Whalers bay (Ilha Deception)
J2B	LAMAI 2448	
J2C	LAMAI 2449	
J2D	LAMAI 2450	

J2E	LAMAI 2451	
J2F	LAMAI 2452	
J3A	LAMAI 2453	Solo - Hennequin
J3B	LAMAI 2454	
J4A	LAMAI 2455	
J4B	LAMAI 2456	Solo - Ilha Rei George Botany point
J4C	LAMAI 2457	
J4D	LAMAI 2458	
J5A	LAMAI 2459	Solo - Ilha Rei George Turret
J5B	LAMAI 2460	
J6A	LAMAI 2461	
J6B	LAMAI 2462	Solo - Punta Hanna (Livingstone)
J6C	LAMAI 2463	
J7A	LAMAI 2464	
J7B	LAMAI 2465	Madeira (Barco) - Whalers bay (Ilha Deception)
J7C	LAMAI 2466	
J7D	LAMAI 2467	
J8A	LAMAI 2468	
J8B	LAMAI 2469	Sedimento Marinho - EACF Heliponto
J8C	LAMAI 2470	
J8D	LAMAI 2471	
EJA	LAMAI 2472	
EJB	LAMAI 2473	Solo - Hennequin
EJC	LAMAI 2474	

Uma maior quantidade de fungos foi obtida a partir de amostras de solo (14 isolados), seguido por sedimento marinho (10 isolados) e madeira (7 isolados), como indicado no gráfico 1.

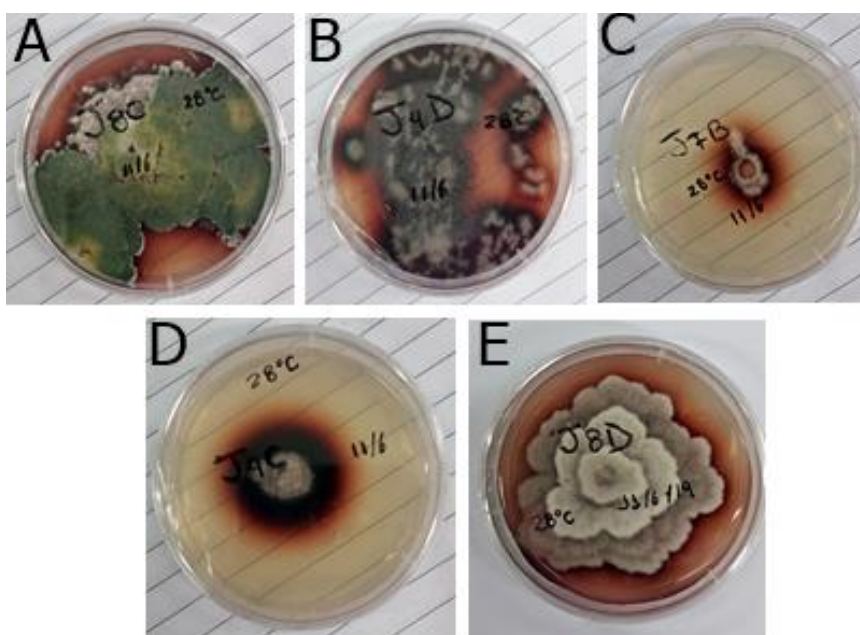
Figura 7. Percentual de fungos isolados de acordo com suas amostras de origem.



4.1. Análise qualitativa e quantitativa da produção de enzimas ligninolíticas

Na triagem qualitativa em meio sólido contendo guaiacol apenas os fungos filamentosos apresentaram coloração amarronzada (formação de tetraguaiacoquinona), indicando a presença da enzima lacase (MOREIRA NETO, 2006). Dentre os 15 isolados filamentosos, 5 foram positivos quando cultivados a 28 °C (J4C, J4D, J7B, J8C e J8D) (Figura 8) e 2 quando cultivados a 15 °C (J8C e J8D).

Figura 8. Fungos filamentosos que apresentaram coloração marrom em Meio B&K + Guaiacol 4 mM a 28 °C; A: J8C, B: J4D, C: J7B, D: J4C, E: J8D.



Os isolados positivos no teste qualitativo foram submetidos a um teste quantitativo das enzimas em meio líquido MM1 + Cloranfenicol 0,15 g/L adicionados de 5g de serragem. Os resultados de atividade de lac, MnP e LiP a 15 e 28 °C estão apresentados nas figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

Os isolados J8C e J8D foram os únicos a apresentar atividade de lacase (figura 9A), manganês peroxidase (figura 10A) e lignina peroxidase (figura 11A) a 15°C. Esses dois isolados foram obtidos a partir de amostra de sedimento marinho e também foram os que apresentaram as maiores atividades de lacase a 28°C (figura 9B).

Quanto a produção da enzima manganês peroxidase a 28°C a quantidade mais expressiva foi apresentada pelo isolado J4D (figura 10B), obtido a partir de amostra de solo.

A enzima lignina peroxidase foi expressa em maior quantidade a 28°C pelo isolado J7B, obtido a partir de amostra de madeira (figura 11B).

Figura 9. Atividade da enzima lacase: A) a 15 °C e B) a 28°C.

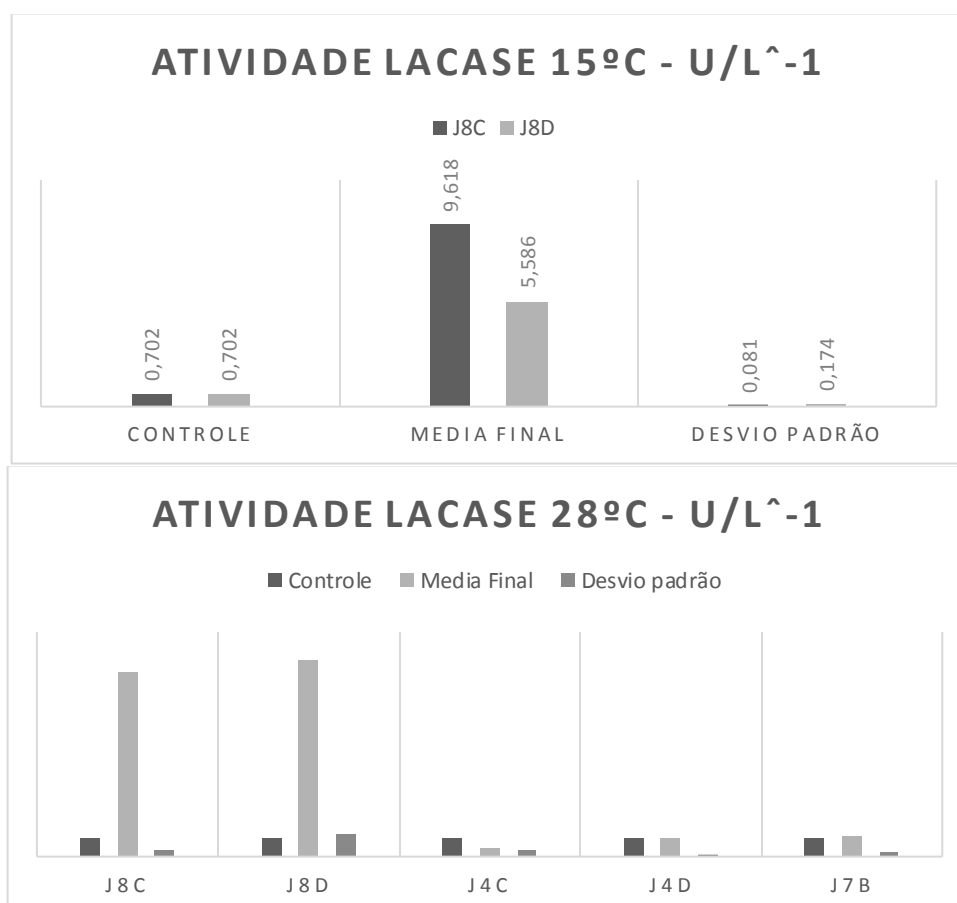


Figura 10. Atividade da enzima manganês peroxidase: A) a 15 °C e B) a 28°C.

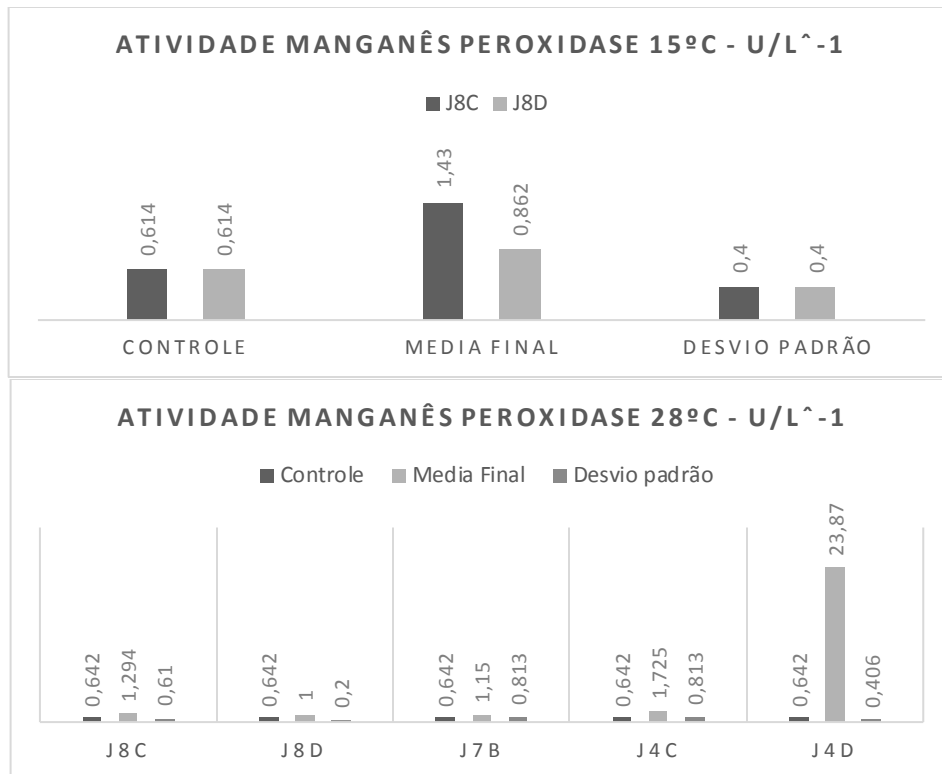
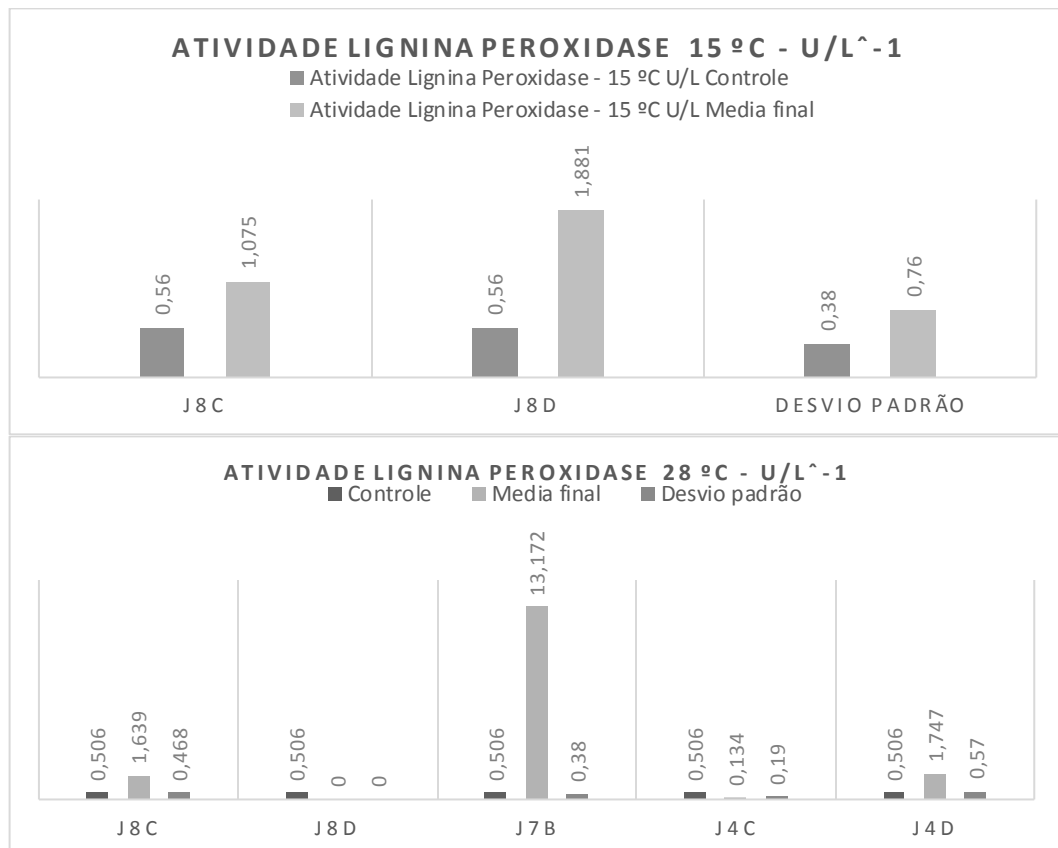


Figura 11. Atividade da enzima lignina peroxidase: A) a 15 °C e B) a 28°C.



5. DISCUSSÃO

O enriquecimento utilizando serragem como única fonte de carbono se mostrou um bom método para isolar fungos potenciais produtores de enzimas ligninolíticas provenientes de amostras da Antártica. Diferentes substratos encontrados na Antártica, como solos, substratos marinhos e rochas, estão diretamente relacionados à distribuição dos fungos que habitam o continente, tendendo a ter menos diversidade da zona marinha até a continental (RUISI et al, 2007). No presente trabalho, uma maior quantidade de fungos foi isolada a partir de amostras terrestres em comparação com as amostras de origem marinha.

De acordo com Duarte et al (2018a), a maioria dos fungos isolados a partir de amostras coletadas na Antártica Marítima (Península Antártica) são psicrotolerantes, tendo em vista ser essa a região Antártica mais distante do polo sul, atingindo temperaturas mais altas do que na região continental. A temperatura de 15 °C favoreceu o isolamento de leveduras, enquanto que a 28°C os fungos filamentosos se desenvolveram melhor.

Os isolados J8C e J8D, obtidos a partir de amostra de sedimento marinho, se destacaram na produção das enzimas ligninolíticas estudadas, sendo os únicos capazes de produzir Lac, MnP e LiP a 15°C. Em adição, foram também os isolados que apresentaram uma maior atividade enzimática de lacase a 28°C. Quanto a produção de MnP e LiP a 28°C, o fungo J4D (isolado de amostra de solo) apresentou maior atividade enzimática para MnP e o fungo J7B (isolado de amostra de madeira) para LiP.

Ainda são poucos os trabalhos que tentam acessar o potencial enzimático de fungos de regiões polares. No trabalho reportado por Duarte et al. (2018b), a maior atividade de LiP em fungos da Antártica foi de 2,25 U/L⁻¹ (produzida foi a 15°C por um fungo filamentoso isolado de amostra de osso de baleia, identificado como *Cosmospora* sp.). A maior atividade de lacase (3,68 U/L⁻¹) foi obtida a 15°C por um isolado proveniente de amostra de madeira, identificado como *Cadophora malorum*. A atividade de MnP não foi detectada a 15 °C para os isolados J8C, J8D, J7B e J4C.

DUARTE 2018, mostra que dentre os 35 isolados provenientes de amostras de solo e solo associado às raízes de *Colobanthus quitensis* e *Deschampsia antarctica* positivos no teste qualitativo, três apresentaram atividade enzimática com valor igual ou superior a 1 U/L⁻¹ para LiP a 15°C: isolado 9P-1.9 (5,41 U/L⁻¹), isolado 12P-3.10B (1,7 U/L⁻¹) e 9P-3.19 (1 U/L⁻¹). A enzima MnP não foi detectada nas condições

estudadas e os valores de lacase detectados foram muito baixos (inferiores a 1 U/L⁻¹).

As atividades enzimáticas observadas foram baixas em comparação com a produção dessas enzimas por fungos basidiomicetos de decomposição branca, os quais são conhecidos pela eficiência e alta produção de enzimas ligninolíticas (SETTE et al., 2008), podendo chegar a valores que ultrapassam os milhares de U/L⁻¹. Entretanto, essa foi uma triagem inicial realizada no intuito de verificar a capacidade desses fungos de origem Antártica quanto à produção dessas enzimas. Estudos posteriores poderão aumentar a capacidade produtiva por meio da variação das fontes de nutrientes e do estímulo através da suplementação do meio com substratos indutores. Compostos aromáticos ou fenólicos e também compostos que são relacionados à lignina ou derivados de lignina têm sido utilizados e reportados como indutores (BARATO, 2014).

Os resultados do presente trabalho destacam o potencial dos fungos de origem marinha Antártica J8C e J8D quanto a produção de enzimas ligninolíticas em temperaturas baixas (15°C) e médias (28°C). Fungos derivados de ambientes marinhos podem ser utilizados para a biorremediação de diversos poluentes ambientais em condições ou processos salinos, como, por exemplo, corantes e efluentes têxteis e HPAs (DUARTE et al. 2018a; VERMA et al. 2010).

6. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para o isolamento seletivo dos fungos de amostras marinhas e terrestres da Antártica foi satisfatória, sendo possível recuperar 31 fungos potencialmente produtores de enzimas ligninolíticas. Dentre esses, 5 isolados apresentaram atividade enzimática para ao menos uma das enzimas estudada. Os fungos J8C e J8D recuperados a partir de amostras de sedimento marinho se destacaram na produção de enzimas ligninolíticas a 15°C. Estudos sobre prospecção, produção e caracterização de enzimas produzidas por fungos da antártica devem ser encorajados, pois podem resultar na obtenção de biocatalisadores eficientes para aplicações a temperaturas baixas e moderadas.

Os resultados do presente trabalho evidenciam a importância da ampliação e manutenção de coleções de culturas microbianas, em especial quando há complexidade e altos custos envolvidos em expedições para coleta de amostras. A coleção de fungos obtida no presente trabalho poderá ser utilizada em estudos futuros de aplicação biotecnológica.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v 82, p 1-28, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>

BARATO, M. B. Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulolíticas a baixas e médias temperaturas. **Tese de Mestrado**, 2014.

BAMFORTH, S.M. & SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 723–736, 2005.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DOS SANTOS VASCONCELOS, M. R.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

CALDWELL, M.M.; BJORN, L.O.; BORNMANN, J.F.; FLINT, S.D.; KULANDAIVELU, G.; TERAMURA, A.H.; TEVINI, M. Effect of increased solar UV -R on terrestrial ecosystems. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v.46, p. 40-52, 1998

CLARKE, A. Evolution, Adaptation And Diversity: Global Ecology In An Antarctic Context. In: HUISKES, A. H. L.; GIESKES, W. W. C.; ROZEMA, J.; SCHORNO, R. M. L.; VAN DER VIES, S. M.; WOLFF, W. J. (Eds). *Antarctic Biology in a Global Context*, **Leiden: Backhuys Publishers**, p. 3-17, 2003.

^ADUARTE, A.W.F.; DOS SANTOS, J.A.; VIANNA, M.V.; VIEIRA, J.M.F., MALLAGUTTI, V.H.; INFORSATO, F.J.; WENTZEL, L.C.P.; LARIO, L.D.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; PESSOA, A.; DURÃES SETTE, L.. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 600–619, 2018.

^BDUARTE, ALYSSON WAGNER FERNANDES NOBRE, F. S. et al. Production of

cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 41, n. 12, p. 2511–2521, 2018.

HIBBETT, D.S.; OHMAN, A.; KIRK, P.M.. Fungal ecology catches fire. **New Phytologist**. v. 184, p. 279-282, 2009.

MONTOYA, Q. V. et al. Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 1, p. 12–24, 2018.

MOREIRA NETO, S. L. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. **Biologia**, p. 110, 2006.

ROYLES, J.; AMESBURY, M. J.; CONVEY, P.; GRIFFITHS, H.; HODGSON, D. A.; LENG, M. J.; & CHARMAN, D. J.. Plants and Soil Microbes Respond to Recent Warming on the Antarctic Peninsula. **Current Biology**, v. 23(17), p. 1702–170, 2013.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.6, p.127–141, 2007

SCHEFFERS, B. R.; JOPPA, L. N.; PIMM, S. L.; & LAURANCE, W. F. What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v 27(9), p. 501–510, 2012.

SELBMANN, L. et al. Resistance to UV-B induced DNA damage in extremetolerant cryptoendolithic Antarctic fungi: detection by PCR assays. **Fungal Biology** v. 115, p. 937-944, 2011.

SETTE, LARA D.; DE OLIVEIRA, VALÉRIA M.; RODRIGUES, MARIA FILOMENA A. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. **Microbiology Australia** 29, 18-20, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

VERMA, A.K., RAGHUKUMAR, C., VERMA, P. et al. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation** v. 21, p. 217–233, 2010.

VASCONCELOS, M. R. S. et al. Pyrene degradation by marine-derived ascomycete: process optimization, toxicity, and metabolic analyses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p. 12412–12424, 2019.

WENTZEL, L.C.P.; INFORSATO, F.J.; MONTOYA, Q.V.; ROSSIN, B.G.; NASCIMENTO, N.R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L.D. Fungi from admiralty bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. **Microbial Ecology**, v. 77, p. 77, 12-24, 2019.

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157(2), p. 174–209, 2008.

JÚLIA LEAL SANCHES

ISOLAMENTO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS DE AMOSTRAS DA
ANTÁRTICA E SUAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

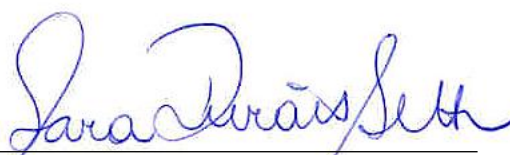
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências
Biológicas.



Júlia Leal Sanches



Dra. Patrícia Giovanella



Profa. Dra. Lara Durrães Sette

Rio Claro
2021