
Biodegradação de Derivados de Petróleo (HPAs) por fungo *Trametes cubensis*

Biodegradation of Petroleum Derivatives (PAHs) by fungus Trametes cubensis

Andrey Azedo Damasceno¹, Ademir Castro e Silva¹, Emerson Guedes Bacelar¹, Marta Regina Silva Pereira^{1*}

¹ Universidade do Estado da Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

*Autor correspondente: omartinhabage@gmail.com

Recebido: 12/02/2020; Aceito: 27/02/2020

RESUMO

Pesquisas estão sendo desenvolvidas utilizando enzimas em várias aplicações industriais especialmente com fungos. A Laccase é uma polifenol oxidase agindo sobre um dador de hidrogênio, podendo ainda atuar em uma ampla gama de substratos, uma característica que direciona seu trabalho em biodegradação de compostos recalcitrantes. Por tanto, dada relevância a pesquisa de buscou alternativas para a produção e caracterização de enzimas de interesse industrial utilizando fungos basidiomicetos, com o objetivo de avaliar a potencial produção de enzimas que degradem HPAs (hidrocarboneto policíclico aromaticos). Após a bioprospecção por meio do teste de Bavendamm, credenciou a espécie *Trametes cubensis* para o teste de tolerância a HPAs. Nos testes de tolerância a espécie de *T.cubensis* demonstrou-se eficiente em todas as concentrações de pireno avaliadas. Na determinação de lacase obtivemos 12.000 U / L em meio Com (HPAs) pireno, o que revela uma alternativa promissora para os Produtos Petrolíferos de biodegradação.

Palavras-chave: Biorremediação, fungos, lacase.

ABSTRACT

Research is being carried out using enzymes in various industrial applications, especially with fungi. Laccase is a polyphenol oxidase acting on a hydrogen donor, and it can also act on a wide range of substrates, a characteristic that directs its work in biodegradation of recalcitrant compounds. Therefore, given the relevance of the search for alternatives for the production and characterization of enzymes of industrial interest using basidiomycete fungi, with the objective of evaluating the potential production of enzymes that degrade PAHs (aromatic polycyclic hydrocarbons). After bioprospecting using the Bavendamm test, he accredited the species *Trametes cubensis* for the HPA tolerance test. In the tolerance tests, the *T. cubensis* species proved to be efficient in all evaluated pyrene concentrations. In the determination of laccase, we obtained 12,000 U / L in Com medium (HPAs) pyrene, which reveals a promising alternative for biodegradation Petroleum Products.

Keywords: Bioremediation, fungi, laccase.

INTRODUÇÃO

A biorremediação entende-se pelo uso de microrganismos, que possam quebrar compostos orgânicos visando utiliza-los como fonte de alimento (BERNOTH et al., 2000). Os produtos oriundos desta degradação são tipicamente CO² e H₂O. O processo de biorremediação de solos compreende a utilização da tecnologia na camada abaixo da lâmina aparente (subsuperfície), incluindo zona vazodica situada acima do lençol freático.

Nesta categoria de aplicação da biorremediação vários microrganismos, dentre eles fungos, bem como nutrientes, tais como fósforo ou nitrogênio, podem ser empregados para implementar o processo de biodegradação (PINEDO-RIVILLA et al. 2009).

Neste caso, o processo resume-se na aplicação de fungos que utilizam os contaminantes orgânicos do sítio como fonte de alimento. Uma vez comprovada a capacidade oxidativa de uma determinada cepa, ou ainda a combinação de várias cepas, deve-se adotar modelo de estudo para verificação do potencial de adaptação/competição com a microbiota nativa, comparando-se os resultados e a cinética obtida. Há um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser usadas em muitos processos de biorremediação, como o tratamento de poluentes (OLIVEIRA, 2005).

O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas têm sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes. As potenciais vantagens do tratamento enzimático, em comparação com os tratamentos convencionais incluem: aplicação dos materiais recalcitrantes; a operação em altas e baixas concentrações de contaminantes ao longo de uma ampla faixa de pH, de temperatura e salinidade; as necessidades de aclimação da biomassa e do processo de controle mais fácil (DURAN e ESPOSITO, 2000).

As pesquisas mais recentes destacam as famílias de enzimas produzidas por fungos lignolíticos: manganês peroxidase (MnP) (E.C:1.11.1), lacases (Lac) (E.C:1.10.3.2) e lignina peroxidase (LiP) (E.C:1.11.1.14), sendo essas duas as mais importantes nos processos de degradação de lignina com uma larga aplicação nas indústrias (ACEVEDO et al., 2011; BETTS, 2012; LI et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Na busca por alternativas para a produção e caracterização das enzimas é que o presente projeto vislumbrou utilizar cepas Amazônicas de fungos basidiomicetos, com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológicos para produção de enzimas de interesse Industrial, evidenciando assim o conhecimento da biodiversidade Amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida na Universidade do Estado da Amazonas (UEA), no Município de Manaus-AM, no Laboratório do Mestrado em Biotecnologia – MBT/UEA. Coletas dos basidiocarpos foram realizadas durante o mês de novembro de 2014, no perímetro da Escola Estadual Maria da Luz Calderaro situada na Cidade de Manaus –Amazonas. Utilizou-se o meio sintético BDA (ágar batata dextrose), sendo 10 g para 450 ml de água destilada, posteriormente o meio foi auto-clavado juntamente com 50 mL de água destilada, após o prévio resfriamento em torno de 30 ± 5C⁰, foi acrescido 2,5 de ácido gálico em condições assépticas.

Após o resfriamento do meio de cultura, o conteúdo do erlenmeyer 125 mL (ácido gálico), foi associado ao de erlenmeyer 500 mL, após a homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri 90 x 15 mm, dos basidiocarpos coletados retirou-se da cada exemplar a ser avaliado um fragmento de aproximadamente (30 mm), para a inoculação, o qual passou por um procedimento de assepsia, segundo a metodologia proposta por Bononi e Trufem, (1985) e Cornelis, (1987). Após estes procedimentos as amostras foram inoculadas, seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), separando cada exemplar fúngico a ser avaliado em placas de

Petri 90 x 15 mm em triplicatas. As placas de Petri, foram repicadas e incubadas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 72 horas para avaliar o potencial das cepas quanto a produção de halos indicadores de enzimas oxidativas.

Teste de Tolerância a (HPAs)

No teste de tolerância, utilizou-se pireno e fenantreno e na proporção 1:1, em três concentrações, sendo 240, 780 e 2.040 U $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo inoculados em placas de Petri 90 x 15mm separadamente e para o grupo controle sem a presença do (HPAs). A atividade foi mensurada um período total de 240 h, sendo mensurada diariamente.

Fermentação Submersa (FSm)

A produção de lacase por fermentação submersa foi conduzida em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de solução nutritiva de meio malte a 2% e acrescido três discos (5 mm) com micélio do fungo *Trametes cubensis*, após 72 h a inoculação, foram adicionado separadamente nos Erlenmeyer pireno e fenantreno e uma associação de pireno + fenantreno 1:1 respectivamente, para o grupo controle procedeu-se da mesma forma descrita a cima com meio malte a 2%, porém sem o contaminante. Os frascos foram mantidos por 15 dias a 30°C , na ausência de luz, com agitação de 180 rpm, sendo retirado a cada 5 dias e filtrada em papel filtro Whatman nº1 e, em seguida, centrifugada a 4000 g, 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação da atividade enzimática de lacase.

RESULTADOS

Das dez linhagens coletadas, cinco apresentam atividade enzimática para fenol-oxidasas (*Perenniporia martia*, *Lentinus crinitus*, *Dantronia brunneoleuca*, *Polyporus sp* e *Trametes cubensis*). Por meio do teste de Bavendamm, foi obtido os melhores resultados para *Polyporus sp* e *Trametes cubensis* (Figura 1) média dos halos de 15 mm e 16 mm em 72h de atividade respectivamente. As espécies *P. martia*, *L. crinitus* e *D. brunneoleuca* obtiveram discreta atividade.

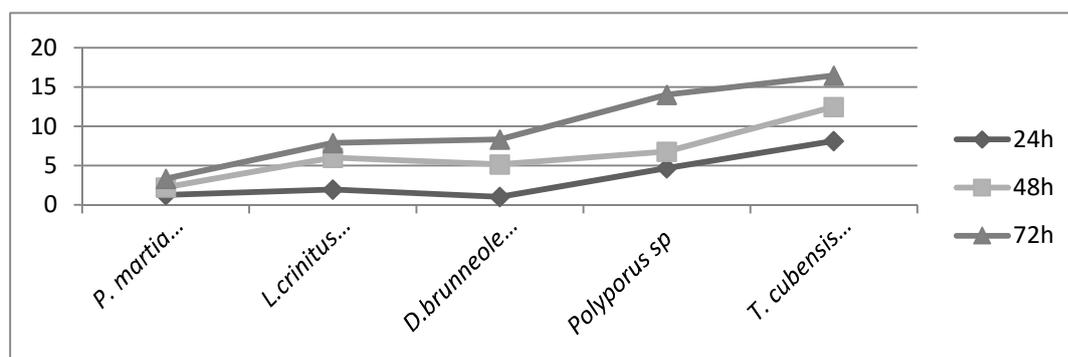


Figura 1. Média das formações dos halos (mm), em 72h de atividades.

Quanto a média dos halos formados, *T. cubensis* apresentou a maior média, já quanto ao coeficiente de variação os dois maiores foram *D. brunneoleuca* e *T. cubensis* (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva do tamanho dos halos formados.

	<i>P. martia</i>	<i>L. crinitus</i>	<i>D. brunneoleuca</i>	<i>T. cubensis</i>	<i>Polyporus sp</i>
Média	(2,23 cm)	(5,30 cm)	(4,84 cm)	(9,19 cm)	(6,30 cm)
Variância	0,75	6,98	10,96	32,05	7,34
CV	38,7%	49,95%	68,36%	61,6%	43,1%-

*CV: Coeficiente de variação.

Evidenciando-se que o diâmetro do halo produzido por *T. cubensis* é maior estatisticamente somente em relação à *P. martia*, ao nível de significância de 99 % sendo, por outro lado, estaticamente igual em relação aos outros fungos testados ao mesmo nível de probabilidade estatística (Tabela 2).

Tabela 2. Teste de Tukey para diferenças significativas entre as médias dos halos ao nível de 99% de significância.

	<i>P. martia</i> (2,23 cm)	<i>L. crinitus</i> (5,30 cm)	<i>D. brunneoleuca</i> (4,84 cm)	<i>T. cubensis</i> (9,19 cm)	<i>Polyporus sp</i> (6,30 cm)
<i>P. martia</i>	-	-	-	P < 0,01	-
<i>L. crinitus</i>	-	-	-	-	-
<i>D. brunneoleuca</i>	-	-	-	-	-
<i>T. cubensis</i>	-	-	-	-	-

De acordo com os dados obtidos (Tabela 1), que indicaram a possibilidade do *T. cubensis* de produzir enzimas oxirredutases passamos para a segunda etapa do projeto, onde foi analisada a tolerância do mesmo em (HPAs), pireno e fenantreno.

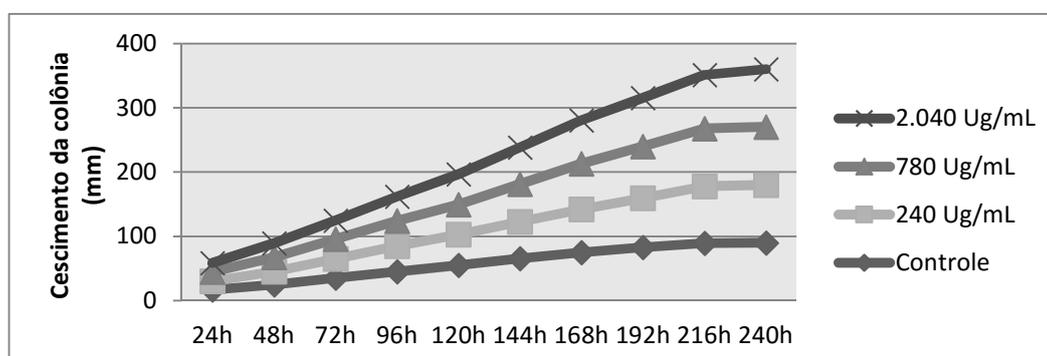


Figura 2: Tolerância do Fungo *T.cubensis* no (HPAs) Pireno em diferentes concentrações no período de 240h de atividades.

No tratamento utilizando o contaminante Pireno (Figura 2), este evidenciou uma promissora tolerância ao mesmo, pois obteve um crescimento micelial próximo ao grupo controle e a partir do nono dia de atividade atingindo a totalidade da placa 90mm, evidenciando o seu potencial biotecnológico frente ao contaminante.

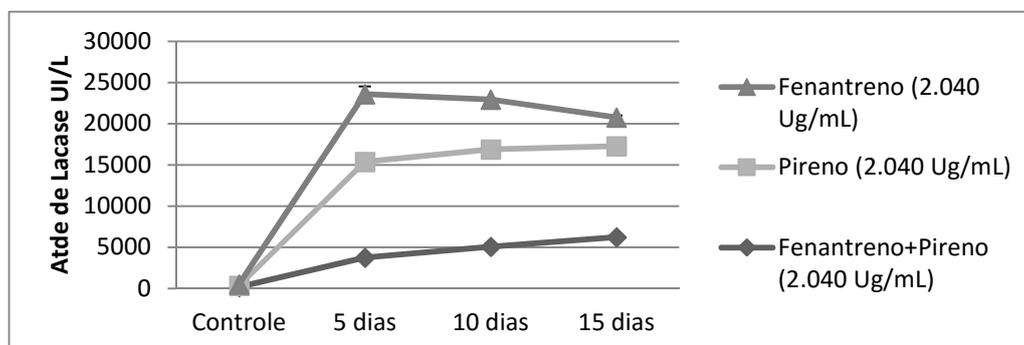


Figura 03: Influência de (HPAs) na produção de lacase por fungo Amazônico *T.cubensis*.

Os resultados de produção enzimática sugerem que, na presença do HPA pireno, pode ter havido indução da produção das enzimas ligninolíticas, uma vez que foi observada uma maior atividade destas enzimas em comparação aos experimentos (Figura 3). Onde obteve um resultado promissor com 12.000 U/L aproximadamente nos 15 dias de atividade, ressalta-se ainda uma produção de lacase substancial frente ao fenantreno, resultado este em discordância com o teste de tolerância em placas aplicado no item a cima, isso possivelmente esta relacionado pois o primeiro passo dos fungos no metabolismo de HPAs é a oxidação do anel aromático catalizada pela enzima mono-oxigenase do sistema CYP para produção de um óxido de areno.

DISCUSSÃO

De modo geral, os resultados obtidos na presente pesquisa indicaram possíveis microrganismos produtores de enzimas fenol-oxidases, como por exemplo *P. martia*, *L. crinitus* e *D. brunneoleuca* que obtiveram uma discreta atividade para o grupo das enzimas oxidativas, isso possivelmente está relacionado com seus metabólitos, como enzimas e polissacarídeos, resultados semelhantes aos encontrados em outros grupos de microrganismos por LEE et al (2014), como exemplo as espécies *Peniophora cinerea* e *Pseudochaete tabacina*.

Nossos resultados estão em concordância com Valle et al. (2014) que encontraram resultados semelhantes na determinação da enzima lacase com *Lentinus crinitus*. Isso possivelmente está relacionado com a atividade enzimática que é diretamente influenciada pelo pH do ensaio, e cada enzima apresenta sua maior atividade em seu pH ótimo. Outro aspecto importante que deve ser bem considerado é o tempo de cultivo do fungo, que pode alterar outras variáveis presentes no meio de cultura, como por exemplo, a umidade, que por sua vez pode afetar significativamente a produção enzimática do microrganismo em estudo. Resultado este em concordância com a literatura consultada. Jong et al. (1992), isolaram e quantificaram a atividade peroxidativa de linhagens de *Trametes*, revelando a habilidade em produzir lacase e manganês peroxidase, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa. O gênero *Trametes* apresentou melhor haloindicativo para fenol- oxidase o que corrobora com estudos anteriores onde tem sido investigado por suas aplicações biotecnológicas por suas atividades enzimáticas como: lacase e manganês peroxidase (KUHAD & SINGH, 2007; JONG et al., 1992). *Trametes* sp. foi o melhor produtor de amilases e celulasas de acordo com Souza et al. (2008).

Diversos fatores influenciam a produção de fenol-oxidases e conseqüentemente a formação de produtos. Pode-se destacar entre outros: a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração (IKEHATA et al., 2004).

As fenoloxidasas são produzidas principalmente por Basidiomycetes da podridão branca, sendo também detectada em fungos da podridão marrom (DURAN e ESPOSITO, 2000).

Em termos de valores absolutos o maior diâmetro do halo foi produzido por *T. cubensis*, enquanto que o fungo *P. martia* apresentou o menor valor para diâmetro do halo. Os outros fungos apresentaram valores similares para esse parâmetro.

Ressalta-se que na presença de enzimas ligninolíticas, fungos de degradação branca podem oxidar HPAs gerando radicais livres hidroxila pela doação de um elétron, que oxida o anel aromático (BAMFORTH e SINGLETON, 2005). Esta reação gera quinonas e ácidos em vez de dihidrodiois. No caso destes fungos, geralmente quinonas são acumuladas como produtos da degradação de HPAs. Sabe-se que as enzimas ligninolíticas, como as Lacases, podem somente clivar o anel aromático, sem induzir a mineralização do HPA (CERNIGLIA, 1997).

A literatura vem apresentando o potencial de diversos fungos filamentosos na degradação de HPAs de baixo e alto peso molecular. A maioria dos fungos degradadores de HPAs e demais poluentes ambientais pertencem aos Filos Basidiomicota e Ascomicota seguido pelo sub-filo Mucoromicotina. Dentre os diversos filamentosos que apresentam representantes com tal característica, Basidiomicota detêm 34% de fungos com habilidades em degradação de poluentes recalcitrantes (HARMS et al., 2011). Outro ponto que merece nossas considerações é que na presença de enzimas ligninolíticas, fungos de degradação branca podem oxidar HPAs gerando radicais livres hidroxila pela doação de um elétron, que oxida o anel aromático (BAMFORTH e SINGLETON 2005). Esta reação gera quinonas e ácidos em vez de dihidrodiois. No caso destes fungos, geralmente quinonas são acumuladas como produtos da degradação de HPAs. Sabe-se que as enzimas ligninolíticas, como as Lacases, podem somente clivar o anel aromático, sem induzir a mineralização do HPA (CERNIGLIA, 1997).

CONCLUSÃO

Das dez cepas Amazônicas avaliadas, cinco apresentaram halos indicativos para enzimas fenol oxidases, evidenciando assim um possível produtor destas enzimas de interesse na Biorremediação Cabe ressaltar que os maiores halos foram obtidos com a espécie *Polyporus sp* e *Trametes cubensis*. Entretanto a maior atividade, foi evidenciada para a espécie *Trametes cubensis*, com média de halos em 72h de atividades de 14 e 16 mm, respectivamente. Nos testes de tolerância a espécie *T. cubensis* mostrou-se eficiente na formação de halos frente ao HPAs Pireno em todas as concentrações Avaliadas 240,780 e 2040 Ug/mL.

Ressalta-se ainda o potencial biotecnológico desta cepa Amazônica para a Produção de Lacase, pois obteve uma média de 12.000 U/L, o que revela uma promissora potencialidade de produção. Apesar do resultado favorável é imprescindível otimizar estes processos, como por exemplo diferentes fontes de carbono; faixa de pH e ainda determinar outras enzimas, avaliar a biodegradação em espectrometria de massa, e purificação da enzima.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo de Pesquisas do Amazonas – FAPEAM; CNPQ e CAPES pelo incentivo a pesquisa e ao Mestrado em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas- UEA/ MBT.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, F.; PIZZUL, L.; CASTILLO, M.D.; CUEVAS, R.; DIEZ, M.C. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracozyllum discolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, p.212-219, 2011.

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.

BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P.; RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Mining, Metallurgy & Exploration**, v.17, p.105-111, 2000.

BETTS, W.B. Biodegradation: Natural and Synthetic Materials. **Springer Science & Business Media**, 2012.

BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B. **Cogumelos comestíveis**. 2 ed. São Paulo: Editora Ícone, 83p.1985.

CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.324-333, 1997.

CORNELIS, P. Microbial amylases. **Microbiological Sciences**, v.4, p.342-343, 1987.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.28, p.83-99, 2000.

EL-BATAL, A. I.; ELKENAWY, N. M.; YASSIN, A. S.; AMIN, M. A. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. **Biotechnology Reports**, v.5, p.31-39, 2015.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature reviews: microbiology**, v.9, n.1, p.177-191, 2011.

JONG, E.; DE VRIES, F.P.; FIELD, J.A.; VANDER ZWAN, R.P. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity. **Mycology Research**, v.96, p.1098-1104, 1992.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: future prospects. **IK International**, 2007.

LI, X.; WANG, Y.; WU, S.; QIU, L.; GU, L.; LI, J.; ZHANG, B.; ZHONG, W. Peculiarities of metabolism of anthracene and pyrene by laccase-producing fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.61. p. 549-554, 2014.

OLIVEIRA, F.J.; FRANÇA, F.P. De Increase in removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during bioremediation of crude oil-contaminated sandy soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121/124, p.593-603, 2005.

PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Pollutants Biodegradation by Fungi. **Current Organic Chemistry**, v.13, 2009.

VALLE, J. S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SANTANA, T. T.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; SOCCOL, C. R. Optimization of *Agaricus blazei* laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p.939-946, 2014.

ZHANG, S.; NING, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, Y.; YANG, X.; WU, K.; YANG, S.; LA, G.; SUN, X.; LI, X. Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.105, p.228-232. 2015.