

Influência de agroquímicos na obtenção de fungos produtores de enzima a partir de solo

Influence of agrochemicals on the production of enzyme-producing fungi from soil

RESUMO

Bruna Alexandra Bohm
bru.bohm@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Viviane da Silva Lobo
vivianelobo@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Alexandre Henrique Gomes de Souza
alexandresouza@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

As enzimas são conhecidas por serem proteínas amplamente empregadas para a catalisação de reações biológicas e podem ser aplicadas na extração de óleos essenciais, aumentando significativamente o rendimento do óleo extraído. Por possuírem alto valor, buscam-se fontes naturais para a obtenção das mesmas. Uma das técnicas utilizadas para a produção de enzimas é a fermentação com fungos filamentosos. Sabendo que o solo é rico em microrganismos, pensou-se nele como fonte de obtenção dos fungos, porém, por ser alvo constante de manejo, esse trabalho busca verificar possíveis influências do uso de agroquímicos na obtenção de fungos que sejam capazes de produzir enzimas. Amostras de solo foram preparadas para o cultivo em placa, com meio PDA e incubadas, as maiores colônias foram selecionadas, diluídas em caldo sabouraud e incubadas. Após isso, alíquotas do caldo com presença de fungos foram novamente plaqueadas para o isolamento das colônias. Em seguida, realizou-se o teste de degradação da celulose, em meio específico. Os fungos que cresceram, são capazes de degradar a celulose e portanto seguem para o processo de produção de enzimas. Até o presente momento não foram visualizadas diferenças significativas na obtenção de colônias, e as mesmas não forneceram fungos capazes de degradar celulose.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima. Fungo. Agroquímico.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Enzymes are known to be proteins widely used for catalyzing biological reactions and can be applied to the extraction of essential oils, significantly increasing the yield of the extracted oil. Because they have high value, they seek natural sources to obtain them. One of the techniques used for enzyme production is fermentation with filamentous fungi. Knowing that the soil is rich in microorganisms, it was thought of as a source for obtaining the fungi, but because it is a constant management target, this work seeks to verify possible influences of the use of agrochemicals to obtain fungi that are capable of producing enzymes. Soil samples were prepared for plating with PDA medium and incubated, the largest colonies were selected, diluted in broth sabouraud and incubated. After that, aliquots of the fungal broth were plated again to isolate the colonies. Then, the cellulose degradation test was performed in a specific medium. The fungi that have grown are able to degrade cellulose and therefore move on to the enzyme production process. To date, no

significant differences in colony production were seen, and they did not provide fungi capable of degrading cellulose.

KEYWORDS: Enzyme. Fungus. Agrochemical.

INTRODUÇÃO

As enzimas são conhecidas por serem proteínas amplamente empregadas para a catalisação de reações biológicas. O seu uso é eficiente e sustentável, o que leva a larga utilização em indústrias dos mais variados moldes. Como suas características benéficas chamam a atenção, passou-se a aplica-las também na extração de óleos essenciais. Como a demanda do mercado cresceu, fez-se necessária a busca por micro-organismos que possam produzir enzimas, e que elas suportem condições variadas de temperatura e pH.

Não sendo diferente, o setor produtor de óleos essenciais visualizou na utilização de enzimas uma maneira de diminuir os custos de produção e aumentar o rendimento, já que os métodos convencionais de extração ainda não são satisfatórios.

Os óleos essenciais são extraídos dos tricomas glandulares de plantas aromáticas a partir de diversos métodos de extração, conforme a necessidade de características específicas do produto final desejado e as particularidades de cada óleo. Apesar das técnicas disponíveis para a extração de óleo essencial serem numerosas, o conteúdo de óleo essencial extraído é muito baixo quantitativamente, chegando a ser inferior a 1%.

Além dos baixos rendimentos, os métodos comuns possuem alguns agravantes como, manutenção e instalação de equipamentos custosa, periculosidade alta pela aplicação de grandes quantidades de solventes e influências na qualidade final do produto pelas altas temperaturas de algumas etapas do processo.

Como alternativa para aumentar a produtividade tem-se o tratamento enzimático em meio aquoso, que se mostrou eficiente na degradação das paredes dos tecidos vegetais propiciando maior rendimento, melhorias na qualidade nutricional e na estabilidade do óleo essencial obtido.

As enzimas comerciais mais utilizadas para esse tipo de extração são as Alcalases, um tipo de protease e a Celluclast, um tipo de celulase. A substituição parcial do solvente por enzimas, na extração de óleos vegetais, forma a base de uma patente publicada por FULLBROOK (UK Patent Application GB 2 127 425 A, nº 8227661, 1984).

O fator limitante do uso de enzimas para a extração de óleos essenciais é o alto custo comercial delas e da quantidade necessária para a extração ser satisfatória. Graças a estes fatores, busca-se a obtenção de enzimas que auxiliem esse processo em fontes naturais.

Uma das técnicas mais utilizadas para a produção de enzimas é a fermentação com fungos filamentosos, já que são excelentes microrganismos, adaptando-se a condições adversas de temperatura e pH.

Como o solo é um ambiente rico em microrganismo e de fácil acesso para a obtenção, pensou-se nele para o isolamento de fungos capazes de produzir enzimas. Mas, quando pensa-se em solo, é necessário levar em consideração suas diferentes formas e manejos.

A quantidade de fungos presente no solo é acentuadamente inferior a quantidade de bactérias, porém, correspondem a um volume de protoplasma maior, pois possuem maiores diâmetros e comprimentos que as bactérias, facilitando também seu isolamento e visualização.

Porém, a microbiologia do solo é diferente para cada tipo de solo. Quando se considera os solos usados para manejos agrícolas é necessário levar em consideração os agroquímicos utilizados.

Os agroquímicos são defensivos agrícolas com ação tóxica, tendo como princípio ativo compostos desenvolvidos para controlar ou erradicar pestes. Sabendo que as substâncias xenobióticas não degradam com a mesma velocidade que as de origem biogênica e que estas são mais bioativas que as moléculas naturais, as moléculas de agroquímicos merecem grande atenção com relação ao seu destino e impacto nos processos do solo e dos ecossistemas.

Sabendo das inúmeras agro utilizações do solo, objetiva-se neste trabalho, determinar se o uso de agroquímicos afeta a produção de enzimas pelos fungos isolados do solo.

MATERIAIS E METODOS

Foram usados para a realização desse projeto mesa agitadora, balança, autoclave, estufa, câmara de fluxo laminado e geladeira, sacos plásticos zipados, placas de petri, erlenmeyer, pipetas, micropipetas, tubo de ensaio, tubos eppendorf, tween 80, meio PDA, meio de cultivo sabouraud, tubo de ensaio, fosfato monopotássico, sulfato de amônio, cloreto de cálcio, estrato de levedura, carboximetilcelulose, ágar, água destilada e amostras de solo.

Foram coletadas seis amostras de solo de diferentes pontos da área rural do município de Itaipulândia, conforme as informações contidas na Tabela 1. Cada amostra foi coletada a uma profundidade de aproximadamente 20 cm, e armazenadas em sacos plásticos zipados na geladeira.

Tabela 1 – Especificações das amostras de solo

Amostra	Agroquímico
1	Randap
2	Nenhum
3	Glifosato
4	Randap
5	Glifosato

Fonte: Autor (2019).

Pesou-se 15 gramas de cada amostra em um erlenmeyer de 100 ml, completando o volume com água estéril, adicionou-se a essa mistura algumas gotas de tween 80 para facilitar o desprendimento do fungo das partículas de solo. Em seguida, levou-se os erlenmeyers para a mesa agitadora a 150 rpm por trinta minutos.

Em ambiente estéril, realizou-se duas diluições 1:10 do líquido dos erlenmeyers. Após as diluições, distribui-se 1000 µL da suspensão diluída nos meios de isolamento previamente preparados em placas de petri, contendo 20 mL de meio de cultivo PDA. Em seguida, levou-se as placas para a estufa onde permaneceram por 7 dias, no escuro a 28 °C.

Preparou-se 20 mL meio de cultivo PDA para seis placa de petri, em seguida passou-se 1000 µL de cada um dos líquido rico em fungos preparado anteriormente, para cada placa, uma placa por amostra de solo. Armazenou-se as placas em estufa por 8 dias, a 28 °C e no escuro.

Preparar meios de cultivo sabouraud para os isolados. Separar 3 tubos de ensaio com tampa para cada erlenmeyer na incubadora e preparar caldo sabouraud, 5 ml para cada tubo utilizado. Esterilizar. Na câmara de fluxo, prosseguir com o processo de isolamento utilizando uma micropipeta e pipetando 1000 µL em três diluições do caldo e depois repicando no meio de cultivo. Após os procedimentos, incubar à 28 °C por 10 dias.

Os microrganismos que estiverem próximos com as características dos fungos serão armazenas em tubos eppendorf previamente esterilizados com 200 µL de água pura e armazenadas em geladeira convencional. Se possível, fazer um novo repique.

Para o teste de degradação da celulose, preparou-se um meio sintético com os reagentes já descritos, onde as amostras isoladas foram repicadas e incubadas por 10 dias. Após esse período os microrganismos que tiveram crescimento, degradaram a celulose no meio, dando a entender que produzem enzimas degradadoras de celulose. Os armazenados serão encaminhados para testes de identificação por biologia molecular.

Como não foram obtidos microrganismos que degradam a celulose nas amostras disponíveis, as seguinte etapa, que é a fermentação para a obtenção de enzimas, ainda não foi realizada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O processo de pesquisa ainda não foi finalizado, e portanto não é possível afirmar que solos com uso de agroquímicos possuem menos ou mais vida microbológica capaz de produzir enzimas. Porém não foram visualizadas diferenças significativas no crescimento microbológico entre as diferentes amostras e não obteve-se crescimento de microrganismos que degradassem celulose.

Esses resultados podem estar relacionados a diversos fatores, como a utilização dos agroquímicos em si, como também a armazenagem das amostras, o tempo de armazenamento e de desenvolvimento da pesquisa.

Para a certificação de que a falta de crescimento de microrganismo capazes de degradar a celulose está relacionada ao uso de agroquímicos, se faz necessário a repetição dos testes como também mais estudo em cima das amostras contaminadas.

A pesquisa em relação aos efeitos de agroquímicos no solo é difícil graças a capacidade adaptativa das populações microbianas ao solo. Comumente os estudos relacionados a isso mostram que os agroquímicos apresentam sim toxicidade para a microbiota do solo, mas ainda não se tem certeza de como.

Outros trabalhos que tratam da influência de agroquímicos na microbiota do solo são, Microbiologia e Bioquímica do solo (Moreira e Siqueira, 2002), Biodegradação (Monteiro, 2001) e Os efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado (Childs, 2007).

CONCLUSÃO

Como o crescimento microbológico necessita de condições adequadas e materiais específicos para ofertar as melhores variáveis de crescimento, o processo de pesquisa segue em andamento. Busca-se compreender ainda mais sobre a influência dos agroquímicos, não apenas para a vida humana, mas sim para todos os seres vivos que tem o solo com ecossistema, sabendo que a pesquisa em relação aos efeitos de agroquímicos no solo pode ser longa e difícil, já que os microrganismos possuem a capacidade de se adaptar a efeitos adversos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao CNPq, a Fundação Araucária e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade e disponibilidade de espaço e material para a realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

[1] SILVA, N. M. R. N. V. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista processos Químicos [online]. Goiânia. N. 5, P. 9-23, Jan, 2009. Disponível em: <https://www.studium.iar.unicamp.br/biblio/guia.html> . Acesso em: 20 jul. 2019.

- [2] SILEVIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. Enciclopédia Biosfera. Goiânia. N. 15, P. 2038-2049. V. 8, Nov, 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20exatas%20e%20da%20terra/levantamento%20e%20analise.pdf> . Acesso em: 20 jul. 2019.
- [3] SANTOS, R. D; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. Campinas, v. 25, n. 1, p. 132-138, jan./mar. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n1/a21v25n1.pdf> . Acesso em: 21 jul. 2019.
- [4] JÚNIOR, S. D. O. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. 2014. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15852/1/SergioDOJ_DISSERT.pdf . Acesso em: 21 jul. 2019.
- [5] MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. 2º ed. Lavras: Editora UFLN, 2006.
- [6] GALLI, F. Microrganismos do solo. V. 21, 1964. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aesalq/v21/21.pdf> . Acesso em: 21 jul. 2019.
- [7] MOREIRA, F. M. S.; SIQUIERA, J. O. Xenobióticos no Solo. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUIERA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 243-28
- [8] MONTEIRO, R. T. R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In-. MELO, I.S. de; SILVA, C.M.M.S. de; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. Biodegradação. JaguariúnaSP: Embrapa Meio Ambiente, 2001. v. 1, p. 1- 14.
- [9] CHILDS, G. M. F. Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotical, 2007. Disponível em: <http://javali.fcav.unesp.br/sgcd/Home/download/pgtrabs/pv/d/2281.pdf> . Acesso em 24 jul. 2019.