Bioprospecção de fungos da podridão branca com potencial para a biorremediação de microplásticos

[1]Maria Eduarda dos Passos Testi (PIC/UEM); [2]Luís Felipe Oliva dos Santos (PBA-UEM); [1]Cristina Giatti Marques de Souza;[1,2]Rosane Marina Peralta.

[1]Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Maringá, PR.
[2]Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental, Maringá-PR

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Microbiologia

Palavras-chave: Basidiomycota; biorremediação; tereftalato de polietileno.

RESUMO

A produção e o uso crescentes de plásticos têm favorecido sua dispersão e persistência em diferentes ambientes, o que reforça a necessidade de estratégias sustentáveis de remediação. Fungos da podridão branca são de interesse por produzirem enzimas oxidativas com ampla especificidade de substrato, potencialmente capazes de atuar sobre compostos recalcitrantes. Este estudo teve como objetivo prospectar fungos capazes de crescer na presença de microplásticos de tereftalato de polietileno (PET-MPs), produzir lacase e interagir com as partículas. Cinco isolados fúngicos, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* e *Hydnopolyporus fimbriatus*, foram cultivados em BDA e avaliados, durante sete dias, em meios com glicose, sem glicose e sem glicose suplementado com PET-MPs, mediante acompanhamento do crescimento radial. Posteriormente, os isolados foram cultivados em meio líquido por 30 dias, e os filtrados dos cultivos foram analisados quanto à atividade de lacase, utilizando ABTS como substrato. Todos os isolados cresceram na presença de PET-MPs, inclusive sob disponibilidade limitada de carbono. No cultivo líquido, observou-se uma camada de biomassa associada às partículas, compatível com colonização superficial. Na presença de PET-MPs, a atividade de lacase foi maior para *T. versicolor* (74,77 U/L), *P. ostreatus* var. *florida* (76,15 U/L) e *P. sanguineus* (57,11 U/L) do que nos respectivos cultivos sem o plástico (29,93, 32,86 e 16,28 U/L). Para *G. lucidum*, a atividade foi menor na presença de PET-MPs (11,84 U/L) do que na ausência (18,61 U/L). Os resultados demonstram tolerância ao PET, associação da biomassa às partículas e resposta da atividade de lacase dependente do isolado, justificando estudos posteriores, mas não comprovam a biodegradação do polímero.

INTRODUÇÃO

Microplásticos podem persistir no ambiente e adsorver poluentes orgânicos e outros compostos tóxicos. O envelhecimento dessas partículas altera sua superfície e pode aumentar sua capacidade de transportar contaminantes, ampliando os riscos de

exposição para os organismos (KARAMI et al., 2018; QIN et al., 2021; LAN et al., 2021). Entre as alternativas biológicas para o tratamento desses resíduos, destacam-se os fungos da podridão branca, pertencentes principalmente ao filo Basidiomycota. Esses fungos produzem enzimas oxidativas extracelulares, como lacases e peroxidases, capazes de transformar a lignina e diferentes compostos xenobióticos. Alguns basidiomicetos também apresentam crescimento e atividade enzimática na presença de materiais plásticos (ONG et al., 2019). Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de cinco isolados de basidiomicetos na presença de microplásticos de PET, sua associação com as partículas e a resposta da atividade extracelular de lacase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivos dos fungos em placas

Foram utilizados os isolados *Pycnoporus sanguineus* (Polyporales, Polyporaceae)*; Trametes versicolor* (Polyporales, Polyporaceae); *Ganoderma lucidum* (Polyporales, Ganodermataceae)*; Pleurotus ostreatus* var*. florida* (Agaricales, Pleurotaceae) e *Hydnopolyporus fimbriatus* (Polyporales, Meripilaceae). As culturas foram mantidas em placas de Petri contendo ágar batata-dextrose (BDA). Após o repique, as placas foram incubadas a 28 °C até a colonização completa e mantidas sob refrigeração por, no máximo, 30 dias antes do uso. Discos de micélio com aproximadamente 1 cm de diâmetro foram inoculados em placas contendo meio mínimo de Vogel e ágar a 1,8% (p/v), sob três condições: com glicose a 2% (p/v), sem glicose ou sem glicose e com 50 mg de PET-MPs. As placas foram incubadas a 28 °C por sete dias, com medição diária do diâmetro das colônias. Ao final, as partículas foram recuperadas por fusão do ágar, lavadas e secas. O mesmo procedimento foi aplicado ao controle abiótico (VOGEL, 1956).

Microplásticos

PET purificado (Merck) foi processado em moinho de bolas e peneirado para a obtenção de partículas com diâmetro inferior ou igual a 5 mm. As partículas foram autoclavadas antes dos ensaios.

Cultivo estacionário em meio líquido

Três discos de micélio com aproximadamente 1 cm de diâmetro foram inoculados em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio de Vogel suplementado com glicose, na presença ou ausência de 50 mg de PET-MPs. Os cultivos foram mantidos sem agitação, a 28 °C, durante 30 dias. Ao final, o conteúdo dos frascos foi filtrado, e os filtrados brutos foram utilizados nas análises enzimáticas.

Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada com ABTS [ácido 2,2′-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] a 1,0 mM como substrato, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (pH 4,0 para *G. lucidum*), a 40 °C. A oxidação do ABTS foi monitorada a 420 nm (ε = 36 mM^{-1} cm^{-1}), conforme descrito previamente (MOTA et al., 2015). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABTS por minuto nas condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos perfis de crescimento mostrou que a presença de PET-MPs não impediu o desenvolvimento dos isolados, embora a resposta inicial tenha variado. *P. sanguineus* apresentou crescimento semelhante ao controle sem PET-MPs ao longo do cultivo. *T. versicolor* apresentou crescimento igual ou superior ao controle e atingiu 8,0 cm no quinto e no sexto dias. *H. fimbriatus* exibiu a maior diferença inicial: no quarto dia, o diâmetro da colônia foi 1,50 cm menor na presença de PET-MPs; apesar disso, o crescimento prosseguiu e alcançou 7,45 cm no sexto dia. *G. lucidum* também mostrou redução inicial, com diferença de 1,30 cm em relação ao controle no quarto dia, mas essa diferença diminuiu para 0,05 cm no sexto dia. *P. ostreatus* var. *florida* apresentou maior crescimento na presença de PET-MPs no terceiro, no quarto e no quinto dias. Somente no sexto dia o controle apresentou diâmetro ligeiramente maior. Em conjunto, os resultados mostram que o efeito inicial dos PET-MPs sobre o crescimento foi dependente do isolado. A aproximação dos valores ao final do experimento indica tolerância às condições avaliadas, mas não permite concluir que o PET tenha sido utilizado como fonte de carbono.

Nos cultivos líquidos, observou-se uma camada superficial de biomassa associada às partículas de PET-MPs. Esse aspecto é compatível com adesão e colonização da superfície e pode envolver a produção de substâncias poliméricas extracelulares, que favorecem a retenção de células e enzimas na interface microrganismo-polímero. Contudo, a observação macroscópica, por si só, não confirma a formação de um biofilme estruturado nem a biodegradação do PET.

Após 30 dias, a atividade de lacase nos filtrados dos cultivos foi maior na presença de PET-MPs para *T. versicolor* (74,77 U/L), *P. ostreatus* var. *florida* (76,15 U/L) e *P. sanguineus* (57,11 U/L) do que nos respectivos cultivos sem o plástico (29,93, 32,86 e 16,28 U/L). Para *G. lucidum*, observou-se o comportamento oposto: 11,84 U/L na presença de PET-MPs e 18,61 U/L na ausência. Portanto, a associação entre PET-MPs e atividade extracelular de lacase foi dependente do isolado. O aumento da atividade em três cultivos pode representar uma resposta às condições impostas pela presença das partículas. Entretanto, não comprova indução direta pelo polímero, seu uso como fonte de carbono ou sua biodegradação.

CONCLUSÕES

Os cinco isolados fúngicos cresceram na presença de PET-MPs, embora *H. fimbriatus* e *G. lucidum* tenham apresentado maior redução inicial do crescimento. A biomassa associada às partículas é compatível com colonização superficial, mas requer confirmação por métodos microscópicos. A presença de PET-MPs também esteve associada ao aumento da atividade de lacase em *T. versicolor*, *P. ostreatus* var. *florida* e *P. sanguineus*; o mesmo não ocorreu nos cultivos de *G. lucidum*. Esses isolados são candidatos a estudos posteriores; contudo, a confirmação da biodegradação dependerá de alterações químicas e redução da massa molar do PET, identificação de produtos e demonstração da assimilação do carbono do polímero.

REFERÊNCIAS

KARAMI, A.; GOLIESKARDI, A.; CHOO, C. K.; LARAT, V.; KARBALAEI, S.; SALAMATINIA, B. Microplastic and mesoplastic contamination in canned sardines and sprats. *Science of the Total Environment*, v. 612, p. 1380–1386, 2018. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.005.

LAN, T.; WANG, T.; CAO, F.; YU, C.; CHU, Q.; WANG, F. A comparative study on the adsorption behavior of pesticides by pristine and aged microplastics from agricultural polyethylene soil films. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 209, 111781, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111781.

MOTA, T. R.; KATO, C. G.; PERALTA, R. A.; BRACHT, A.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, 351, 2015. https://doi.org/10.1007/s11270-015-2612-2.

ONG, H. G.; LUM, H. W.; DING, D. Q.; WONG, K. K.; WONG, L. S. The growth and laccase activity of edible mushrooms involved in plastics degradation. *Current Topics in Toxicology*, v. 15, p. 57–62, 2019.

QIN, M.; CHEN, C.; SONG, B.; SHEN, M.; CAO, W.; YANG, H.; ZENG, G.; GONG, J. A review of biodegradable plastics to biodegradable microplastics: another ecological threat to soil environments? *Journal of Cleaner Production*, v. 312, 127816, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127816.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, v. 13, p. 42–43, 1956.