

PROSPECÇÃO DE FUNGOS DE INTERESSE INDUSTRIAL ISOLADOS DE SOLO IMPACTADO COM RESÍDUO SÓLIDO DE SAÚDE

PROSPECTING FUNGI OF INDUSTRIAL INTEREST ISOLATED FROM SOIL IMPACTED WITH SOLID HEALTH WASTE

DOI: <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v11.e3.a2023.pp2996-3003> Recebido em: 25.06.2023 | Aceito em: 12.07.2023

Sthefany Lima Pires, Sarah Vieira Guimarães, Geovanna da Silva Pinho Belém, Suélem dos Santos Amaral Gouveia, Priscila Soares Sabbadini, Danyelle Cristina Pereira Santos, Rita de Cássia Mendonça de Miranda

Universidade Ceuma
*E-mail: rita.miranda@ceuma.br

RESUMO

A composição do solo de lixões apresenta uma microbiota diversificada, a qual atua na decomposição e biorrecuperação do solo, além de produzir compostos e enzimas extracelulares essenciais e com bioatividade de interesse industrial e biotecnológico. Com base nisso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade enzimática dos microrganismos isolados do solo de lixão da região de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil. Para isolamento dos microrganismos, as amostras de solo foram sujeitas a diluições seriadas decimais e inoculadas em meios de cultura convencionais, a 28°C por 7 dias, para isolamento e numeração. Utilizou-se a técnica de microcultivo para análise das características morfológicas e identificação a nível de gênero dos microrganismos isolados. Posteriormente, para análise enzimática qualitativa, realizou-se os testes de protease e lipase, em meios específicos, com incubação a 28°C em observação constante em um período de 72 horas a 7 dias. Dos três isolados provenientes do solo de um lixão da cidade Apicum-Açu, foi possível identificar microscopicamente a presença de *Aspergillus* sp. Todos os isolados apresentaram positividade para a produção de protease, enquanto somente os isolados 2 e 3 foram positivos para a produção de lipases. Dessa forma, evidencia-se a importância da busca por microrganismos de interesse presentes em diferentes biomas e condições ambientais, como o solo de lixão trabalhado no estudo, necessitando-se, assim, de estudos mais aprofundados desses isolados, que permitirão uma caracterização mais completa de seus benefícios para a indústria tecnológica e ambiental.

Palavras-chave: Descargas a céu aberto; Enzimas; Microbiologia do solo.

ABSTRACT

The soil composition of landfills presents a diversified microbiota, which acts in the decomposition and biorecovery of the soil, in addition to producing essential extracellular compounds and enzymes with bioactivity of industrial and biotechnological interest. Based on this, the present project aims to evaluate the enzymatic activity of microorganisms isolated from the soil of dumps in the region of Apicum-Açu, Maranhão, Brazil. For isolation of microorganisms, soil samples were subjected to serial decimal dilutions and inoculated in conventional culture medium, at 28°C for 7 days, for isolation and numbering. The microculture technique was used to analyze the morphological characteristics and identify the isolated microorganisms at the genus level. Subsequently, for qualitative enzymatic analysis, protease and lipase tests were performed, in specific culture medium, with incubation at 28°C under constant observation over a period of 72 hours to 7 days. Of the three isolates from the soil of a landfill in the city of Apicum-Açu, it was possible to identify macro and microscopically the presence of and *Aspergillus* sp. All isolates were positive for protease production, while only isolates 2 and 3 were positive for lipase production. Thus, the importance of the search for microorganisms of interest present in different biomes and environmental conditions, such as the landfill soil worked on in the study, is evident, thus requiring more in-depth studies of these isolates, which will allow a more complete characterization of its benefits for the technological and environmental industry.

Keywords: Open dumps; Enzymes; Soil microbiology.

INTRODUÇÃO

O solo é um habitat diversificado, tendo em sua composição fatores físicos, químicos e biológicos, para garantia da sua qualidade. Em seus componentes biológicos, o solo apresenta uma microbiota variada, com microrganismos que atuam em ciclos bioquímicos para manutenção da vida e do meio ambiente, encontrando-se espécies de fungos, bactérias, algas, protozoários e vírus residentes desse local (FIDELIS et al., 2016; FREITAS et al., 2017).

Esses microrganismos são responsáveis por diversas atividades, como a decomposição de compostos complexos em pequenas moléculas, mineralização, fixação de nitrogênio, biorremediação do solo contaminado por agrotóxicos, produção de compostos e enzimas extracelulares para adaptação e competição por espaço. Além disso, a microbiota do solo auxilia na produção de nutrientes e outros elementos vitais para a biodiversidade vegetal e animal (LEAL et al., 2021).

Em ambientes, como o lixão, o solo é exposto a contaminação por diversos resíduos, desde materiais hospitalares, gases e metais pesados. Diante disso, salientando-se que o solo já é normalmente um ambiente estressante, e devido a sua contaminação, os microrganismos que habitam nesse local precisam desenvolver estratégias para garantia de sobrevivência (MUNOZ-ROJAS et al., 2016).

Uma dessas estratégias é a produção enzimática, sendo os microrganismos a mais importante fonte de produção enzimática de interesse industrial e biotecnológico. Essas enzimas possuem diversas atividades biológicas e participam essencialmente na qualidade do solo, sendo responsáveis pela quebra de substâncias para o metabolismo energético, e podendo estar envolvidas nos processos de formação de estruturas, como a parede celular, e germinação de esporos microbianos (JANUSCKIEWICZ et al., 2019; PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2017).

Sabendo que o solo de lixões é rico em substâncias contaminantes, as quais servem de substrato para o metabolismo energético de microrganismos, e que as espécies residentes de solos contaminados produzem enzimas que auxiliam na sobrevivência em ambientes hostis, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade enzimática dos microrganismos isolados do solo

de lixão da região de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.

METODOLOGIA

Coleta de amostras de solo

O solo utilizado para isolamento de microrganismos foi coletado de forma randômica em dez pontos distintos, do lixão situado na região do município de Apicum-Açu, localizada no estado do Maranhão, Brasil (Latitude: 1° 34' 37" Sul e Longitude: 45° 4' 46" Oeste).

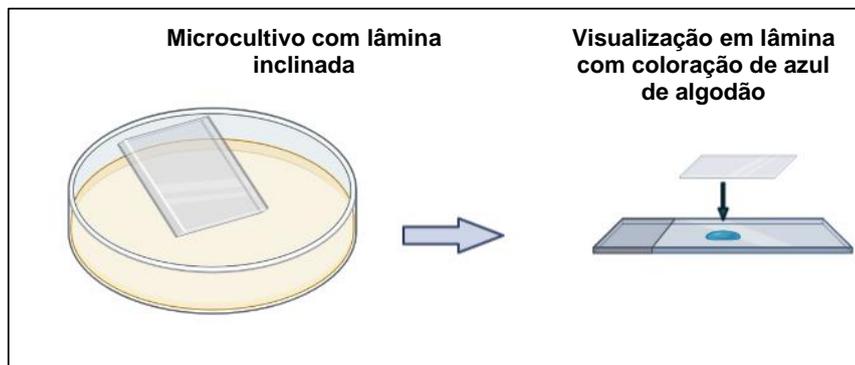
Isolamento

Para realização do isolamento foi utilizada a técnica de diluição seriada de acordo com Clark (1985), onde foi preparada uma solução contendo 10 g de amostra composta do solo impactado e adicionados em 90 ml de solução salina (0,9%), sendo homogeneizados durante cinco minutos. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 1 ml da suspensão, que foi diluída em 9 ml de soro fisiológico, seguindo diluições seriadas decimais até 10^{-5} . Utilizou-se alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} para semeadura e inoculação, em duplicata, nos meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e Ágar Batata natural, sendo armazenados em estufa a 28° durante um período de 7 dias. Após, conseguiu-se isolar 3 colônias de microrganismos, identificados e enumeradas como isolados 1, isolados 2 e isolados 3.

Microcultivo

Para identificação presuntiva a nível de gênero, realizou-se a técnica de microcultivo para análise das características morfológicas dos isolados, conforme o método de Holt, Williams e Sharpe (1989) com adaptações. As placas foram montadas contendo meio de cultura BDA. As cepas foram semeadas nas placas, e posteriormente uma lamínula foi inserida de forma inclinada ao meio (Figura 1). Estas foram armazenadas em estufa a 28°C por 5 dias. Após, procedeu-se a retirada da lamínula sobrepondo-a sobre uma lâmina e coradas com azul de algodão para análise em microscópio óptico em objetiva de 40x.

Figura 1. Microcultivo para identificação dos isolados do solo de lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Fonte: Autores, 2023

Ensaio enzimático

Protease

Para a avaliação da produção de protease, foi preparado 250 mL meio de cultura, contendo 0,05 g de sulfato de magnésio, 0,025 g de cloreto de sódio, 0,1 g de extrato de leveduras, de 0,1 g fosfato de potássio monobásico, 0,025 g de fosfato de potássio dibásico, de 3,75 g de ágar bacteriológico e 4 g de leite em pó desnatado. Após preparo, este foi levado a esterilização e em seguida distribuídos em placas de Petri, até solidificação. As cepas foram inoculadas em quatro quadrantes das placas e levadas a incubação em 28°C durante 72h. Para verificação da presença de halos transparentes, adicionou-se ácido acético 5% (v/v) às placas (OLIVEIRA et al., 2012).

Lipase

Para a metodologia, o meio de cultura utilizado foi adaptado de Cruz (1985) e Sejas (2002). Primeiramente realizou-se a preparação da emulsão em um erlenmeyer (250 mL) contendo 0,25 g de margarina, 5 g de BDA e 25 ml água destilada. Posteriormente, em um segundo erlenmeyer (250 mL), foi realizado o preparo do meio, adicionando-se 1,42 g de peptonas, 0,85 g de extrato de

carne e 225 ml de água destilada. Em seguida, foram esterilizados separadamente, resfriados a 50°C e aditados vigorosamente. Após esse processo, foram acrescentados os 25 ml da emulsão aos 225 ml de meio, adicionados em placa de Petri. Para a avaliação das enzimas lipolíticas, as cepas foram inoculadas em quatro quadrantes das placas, e levadas a incubação em estufa a 28°C por um período de 7 dias. Para observação da atividade, foi observada a formação de halos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lixões se caracterizam pela alta carga de resíduos sólidos no solo sem qualquer manejo específico, visando diminuir os impactos ambientais desses depósitos (OLIVEIRA et al., 2016). A análise dos componentes químicos, físicos e biológicos são amplamente aplicados para avaliar a saúde do solo dessas áreas, principalmente para o estabelecimento de medidas e intervenções mais adequadas para recuperação ambiente em degradação (FIDELIS et al., 2016; FREITAS et al., 2017).

Nesse estudo, foram isolados 3 microrganismos componentes da microbiota residente do solo do lixão da região de Apicum-Açu, no Maranhão, e testado a capacidade desses isolados de produzirem enzimas. Os principais resultados microbiológicos e de produção enzimática resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação e atividade enzimática de isolados de lixão (2023)

Isolado	Identificação	Atividade enzimática	
		Protease	Lipase
Isolado 1	<i>Aspergillus</i> sp.	+	-
Isolado 2	<i>Aspergillus</i> sp.	+	+
Isolado 3	<i>Aspergillus</i> sp.	+	+

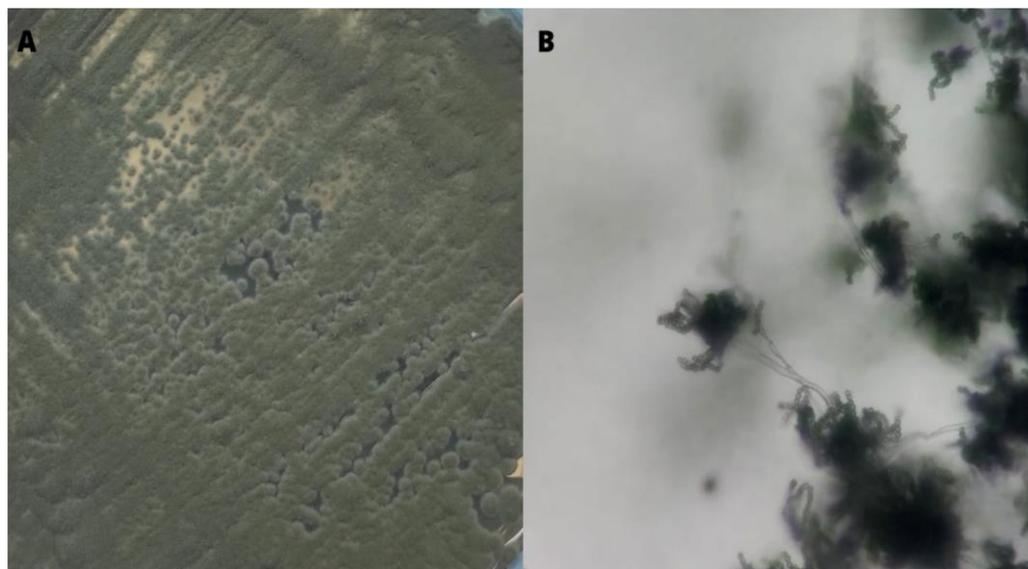
Legenda: +: positivo; -: negativo

Fonte: Autores (2023)

Foram analisadas as características macro e microscópicas das colônias para a identificação a nível de gênero. O isolado 1 foi identificado como *Aspergillus* sp., com colônias acinzentadas, micélio aéreo predominante e

liberação de pigmento escuro (Figura 2A), além da observação de hifas cenocíticas, com a formação de esporos em arranjo de flor (Figura 2B).

Figura 2. Análise macro e microscópica do isolado 1 (*Aspergillus* sp.) do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.

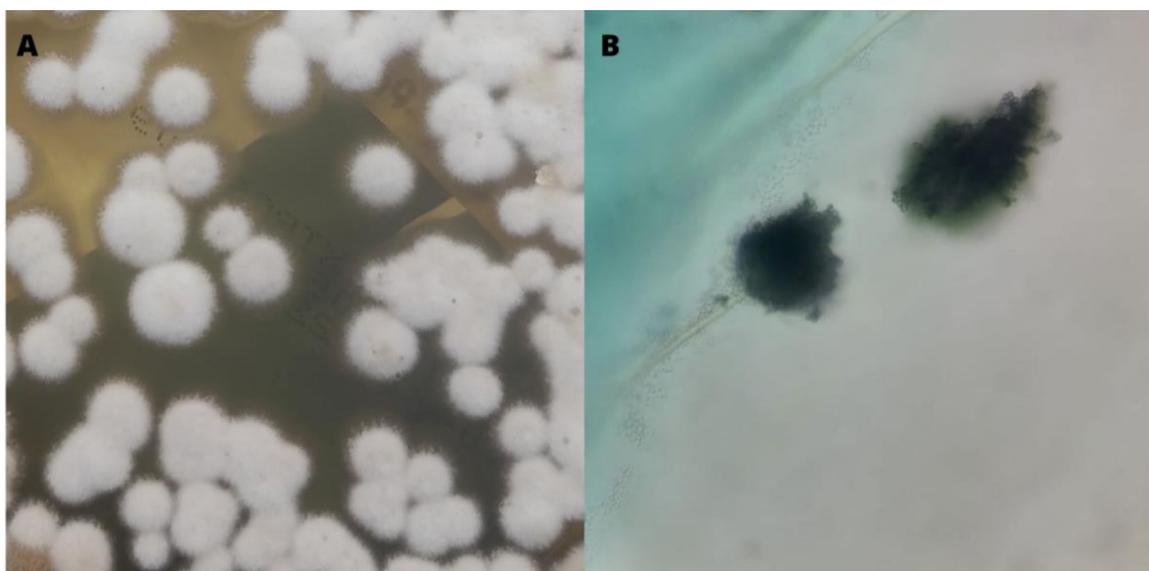


Fonte: Autores, 2023

O isolado 2 foi identificado como *Aspergillus* sp., apresentando colônias esbranquiçadas e micélio aéreo predominante (Figura 3A), com hifas cenocíticas e

formação de esporos em espiral em arranjo de flor (Figura 3B).

Figura 3. Análise macro e microscópica do isolado 2 (*Aspergillus* sp.) do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.

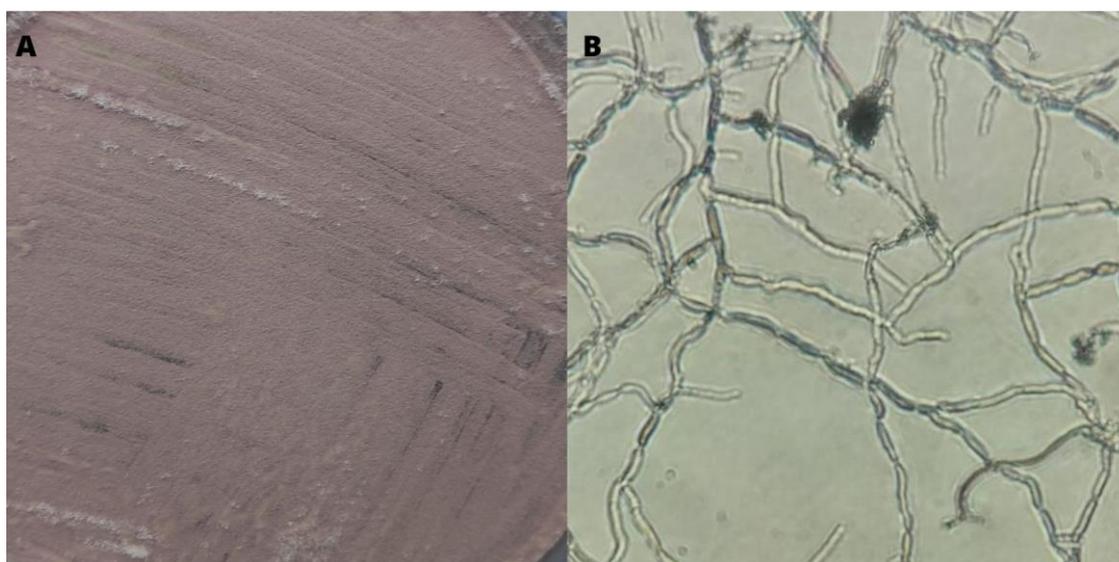


Fonte: Autores, 2023

O isolado 3, identificado como *Aspergillus* sp., apresentou colônias acinzentadas, com micélio aéreo predominante e liberação de pigmento rósea (Figura 4A),

sendo caracterizado por hifas septadas e cabeça aspergilar com esporos em formação floral (Figura 4B).

Figura 4. Análise macro e microscópica do isolado 3 (*Aspergillus* sp.) do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Fonte: Autores, 2023

Os microrganismos presentes no solo, como *Aspergillus* sp., são agentes na manutenção do equilíbrio ecossistêmico local. Por serem, em sua maioria, quimioheterotróficos, os microrganismos podem metabolizar polímeros complexos do solo como fonte de energia, participando ativamente da ciclagem de biomassa, da degradação de substâncias orgânicas e de ciclos de compostos importantes, como carbono, nitrogênio e fósforo (MEIJ et al., 2017).

Essa atividade metabólica se deve principalmente pela produção de enzimas, que são uma parte ativa do metabolismo para a obtenção de energia e podem ser isoladas de fontes vegetais, animais e microbianas. No metabolismo energético, as enzimas são componentes catalisadores, geralmente de característica proteica, com ação intra e extracelular de intermediar e acelerar reações químicas (RAVINDRAN et al., 2018).

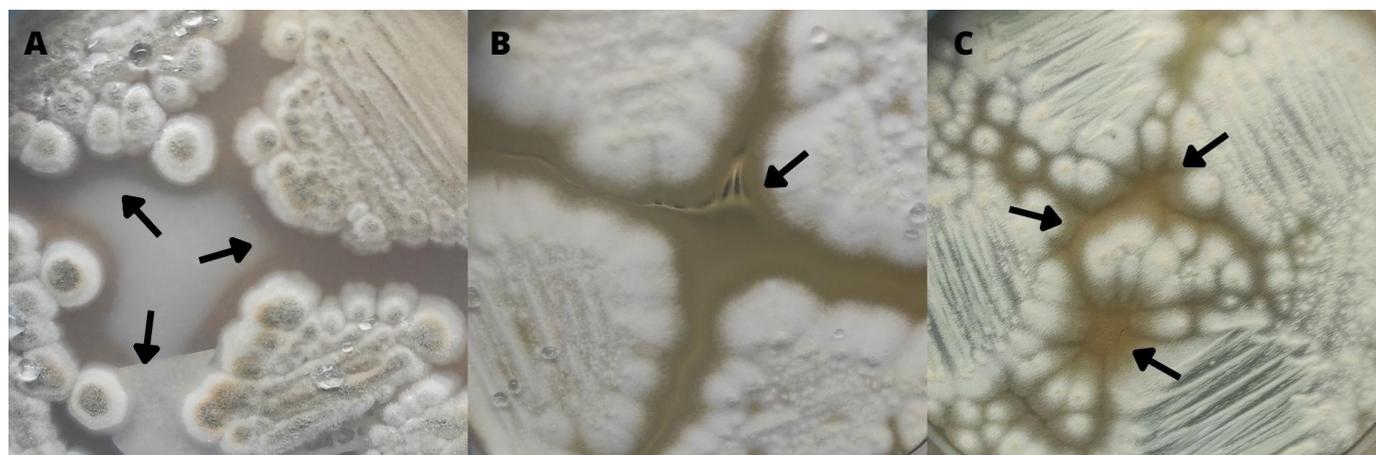
É importante citar que os microrganismos que vivem nessas regiões adversas e de estresse, como o solo de lixões, tendem a se adaptarem ao meio para sua sobrevivência (MUNOZ-ROJAS et al., 2016). Dessa forma, a quali e quantificação das enzimas dispersas no solo ou produzidas *in vitro* por esses microrganismos

isolados fazem parte do processo de análise dos componentes do solo, indicando os artifícios metabólicos necessários para a sobrevivência naquele nicho e, conseqüentemente, fornecendo dados sobre o nível de degradação local (YADA et al., 2015).

Entre as principais enzimas produzidas por microrganismos, pode-se citar as proteases e lipases. As proteases, também conhecidas como peptidases, são pertencentes ao grupo das enzimas hidrolases e possuem multifunções orgânicas, catalisando variados polímeros proteicos em peptídeos e aminoácidos (NNOLIM; OKOH; NWODO, 2020). As lipases, também conhecidas como glicerol éster hidrolase ou triacilglicerol acilidrolase, pertencem ao grupo das enzimas catalisadoras de reações de hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácido graxo em uma interação óleo-água (JAVED et al., 2018).

No presente estudo, foi verificada a capacidade dos isolados de solo de lixão de Apicum-Açu em produzir proteases e lipases (Tabela 1). Observou-se que todos os isolados apresentaram positividade para a produção de protease (Figura 5), enquanto somente os isolados 2 e 3 foram positivos para a produção de lipases (Figura 6).

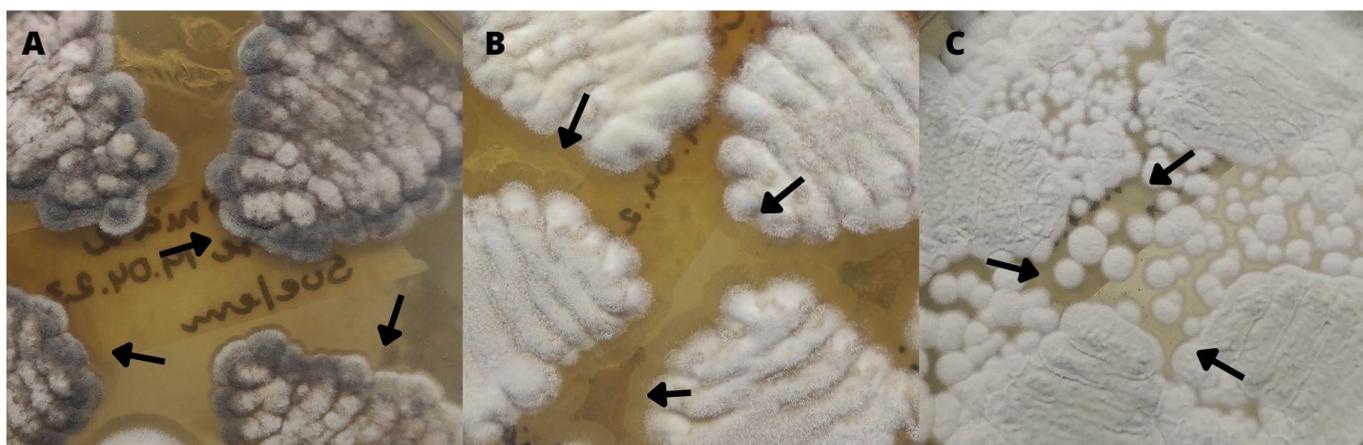
Figura 5. Análise da produção de protease das cepas de *Aspergillus* sp. isoladas do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Legenda: A: Isolado 1; B: Isolado 2; C: Isolado 3;

Fonte: Autores, 2023

Figura 6. Análise da produção de protease das cepas de *Aspergillus* sp. isoladas do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Legenda: A: Isolado 1; B: Isolado 2; C: Isolado 3;

Fonte: Autores, 2023

Não se encontrou na literatura análises enzimáticas de microrganismos isolados de solo de lixão. Porém, é crescente o estudo industrial e ambiental da produção de enzimas por microrganismos, as quais, se produzidas sob condições laboratoriais favoráveis, podem proporcionar bioatividades de interesse biotecnológico, farmacêutico, médico e alimentício (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2017).

As proteases e lipases são amplamente valorizadas à nível comercial e industrial, devido sua fácil extração e diversidade de uso, a exemplo da produção de detergentes, rações e couros, desenvolvimento de medicamentos,

produção de biocombustíveis, alimentos e cosméticos, além de outras funções (PATEL; SINGHANIA; PANDEY et al., 2017; SHARMA et al., 2019).

Entre os microrganismos produtores dessas enzimas, destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Lactobacilos*, *Serratia*, entre outros (KOVACIC et al., 2019; SHARMA et al., 2019; GIMENES; SILVEIRA; TAMBOURGI, 2021). Se tratando de solo contaminados por resíduos sólidos em lixões, a biorremediação de locais com impactos ambientais utiliza dos estudos das características metabólicas dos microrganismos residentes para a

recuperação ambientais com mínima intervenção antrópica possível (FIDELIS et al., 2016).

Partindo desses conhecimentos, nesse projeto, foi possível confirmar a presença de espécie já característica da microbiota de solo, tratando-se de *Aspergillus* sp., com positividade para a produção de enzimas e já estudada, não somente em avaliações clínicas, mas também na indústria biotecnológica para a busca de benefícios socioeconômicos

No entanto, ressalta-se que estudos demonstram que a microbiota residente em espaço de depósitos de resíduos sólidos é singular, uma vez que lixões e aterros demandam uma área de ocupação grande, não seguindo um padrão de depósito desses resíduos, modificando a disposição de microrganismos no solo e dificultando a comparação ou reprodução de resultados (ZEPEDA; LEÓN; FLORES, 2015). Dessa forma, as avaliações de microrganismos presentes no solo de lixões necessitam de análise de caso a caso, podendo apresentar resultados corroborativos ou divergentes, até mesmo, dentro de uma mesma amostra coletada

CONCLUSÃO

Dos três isolados provenientes do solo de um lixão da cidade Apicum-Açu, estado do Maranhão, foi possível identificar macro e microscopicamente a presença de *Aspergillus* sp. Todos os isolados demonstraram a produção de enzimas proteolíticas, enquanto somente os isolados 2 e 3 apresentaram positividade para enzimas lipídicas. Dessa forma, evidencia-se a importância da busca por microrganismos de interesse presentes em diferentes biomas e condições ambientais, como o solo de lixão trabalhado no estudo, necessitando-se assim, de estudos mais aprofundados desses isolados, que permitirão uma caracterização mais completa de seus benefícios para a indústria tecnológica e ambiental.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade CEUMA, a Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão por oferecer meios e oportunidades para realização deste trabalho. À engenheira ambiental Sielys dos Santos Amaral, gestora de limpeza urbana do município de Apicum-Açu (MA), pelo solo foi coletado.

REFERÊNCIAS

- CLARK, E.H. II. The off-site costs of soil erosion. *J. Soil Water Conserv.*, 40:19-22, 1985.
- CRUZ, L. C. H. *Micologia Veterinária*. Itaguaí. 2º ed. UFRJ, 1985.
- FIDELIS, R.R. et al. Indicadores biológicos de qualidade do solo em culturas intercalares ao pinhão manso. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, v. 9, n. 3, 87-95, 2016.
- FREITAS, L. et al. Indicadores da qualidade química e física do solo sob diferentes sistemas de manejo. *Unimar Ciências*, v. 26, n. 1-2, p. 8-25, 2017.
- GIMENES, N.C.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E.B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation and Purification Reviews*, v. 50, n. 3, p. 223-243, 2021.
- HOLT, J. G.; WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 4, p. 2300- 2648, 1989.
- JANUSCKIEWICZ, E. R. et al. Atividade enzimática do solo de pastos de *Brachiaria* manejados sob ofertas de forragem. *Boletim de Indústria Animal*, v. 76, 2019.
- JAVED, S. et al. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 132, p. 23-34, 2018.
- KOVACIC, F. et al. Classification of lipolytic enzymes from Bacteria. In: ROJO, F. (ed.) *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils and lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin: Springer Cham, 2019.
- LEAL, M. L. et al. Efeito dos sistemas de manejo e do uso do solo na população de microrganismos do solo. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, p. e21910917966, 2021.
- MEIJ, A.V.D. et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology*

Reviews, v. 41, n. 3, p. 392–416, 2017.

MUNOZ-ROJAS M. et al. Soil physicochemical and microbiological indicators of short-, medium- and long-term post-fire recovery in semi-arid ecosystems. *Ecological Indicators*, v. 63, p. 14–22, 2016.

NNOLIM, N.E.; OKOH, A.I.; NWODO, U.U. Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. *Biotechnology Reports*, v. 27, p. e00483, 2020.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 6, 2012.

OLIVEIRA, B.O.S. et al. Avaliação dos solos e das águas nas áreas de influência de disposição de resíduos sólidos urbanos de Humaitá, Amazonas. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 21, n. 3, 593-601, 2016.

PATEL, A.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, p. 13-41, 2017.

RAVINDRAN, R. et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. *Bioengineering*, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

SEJAS, F. Análise e Quantificação de Enzimas Produzidas pelo Fungo Endofítico Entomopatogênico *Paecilomyces* sp. Isolado da Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

SHARMA, M. et al. A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, v. 15, n. 2, p. 69–78, 2019.

YADA, M.M. et al. Atributos químicos e bioquímicos em solos degradados por mineração de estanho e em fase de recuperação em ecossistema amazônico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 39, n. 3, 714-724, 2015.

ZEPEDA, A.E.; LEÓN, A.V.P, FLORES, A.S. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in genetics*, v. 6, p. 348, 2015.