

ANAIS

EICTI 2017

6° Encontro de
Iniciação Científica

2° Encontro de Iniciação
ao Desenvolvimento
Tecnológico e Inovação

4 a 6 de outubro de 2017

Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)
Av. Tarquínio Joslin dos Santos, nº 1000
Foz do Iguaçu, Paraná – Brasil



Realização:



Apoio:



AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y POTENCIAL ENZIMÁTICO DE HONGOS DE LA REGIÓN DEL PARQUE NACIONAL DE IGUAZÚ - PARANÁ

NARANJO, Samantha Beatríz E.

Estudiante de la Carrera de Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad,
voluntario IC – ILACVN – UNILA;
E-mail: samantha.naranjo@aluno.unila.edu.br;

SANTOS, Rafaella C. B.

Docente de la Carrera de Ciencias Biológicas-Ecología y Biodiversidad –
ILACVN – UNILA.
E-mail: rafaella.santos@unila.edu.br.

1 INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional Iguazú (PNI), el mayor remanente forestal del Bosque Atlántico, está básicamente formado por suelos arcillosos con alto contenido de hierro (Schobbenhaus et al, 2002). Esta variable ambiental puede haber propiciado la adaptación de microorganismos que puedan proporcionar ventajas biotecnológicas en relación a otros ya descritos; no obstante, la incalculable diversidad fúngica es prácticamente desconocida en el PNI. Por otro lado, la acelerada degradación de los ambientes naturales y la notable eficiencia de la bioprospección a partir de microbiota han intensificado el estudio de esta última en diversos hábitats, a nivel morfológico, molecular y funcional. Las enzimas fúngicas, de hecho, son de interés por su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas e industriales; por ejemplo, las lacasas, un tipo de ligninasas, son las principales catalizadoras de la lignina y de una amplia gama de sustratos problemáticos para el medio ambiente. En ese sentido, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la diversidad estructural, funcional y biotecnológica de los hongos de la región del PNI. Los resultados obtenidos servirán de base para futuras investigaciones biotecnológicas.

2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Los terrenos del PNI pertenecen al dominio geotectónico de las efusivas volcánicas, al derivar de extensos derrames volcánicos. Dicho dominio está constituido por las efusivas basálticas (basalto), generalmente de composición básica, y por esporádicas efusivas ácidas e intermediarias; así, prácticamente

toda el área del PNI es formada por basalto, que origina los suelos argilosos y ferralíticos que albergan núcleos biológicos con gran diversidad (Schobbenhaus et al, 2002).

La diversidad fúngica, vasta y poco conocida, tradicionalmente ha sido estudiada desde un foco morfológico, pero solo la adición de técnicas moleculares ha permitido grandes avances. La identificación a nivel de especie, muchas veces obtenidas apenas con técnicas moleculares, es de extrema importancia para la evaluación de la biodiversidad, del punto de vista estructural y funcional en el ambiente, además de ser indispensable para las aplicaciones biotecnológicas.

En micología existe un intenso estudio de las enzimas fúngicas por presentar un importante papel ecológico, principalmente en los ciclos biogeoquímicos, e industrial, entre las cuales se destacan las lacasas (fenol oxidasas). Estas son encontradas ampliamente en los hongos de pudrición blanca y en el suelo (Baldrian, 2005). Junto con las manganeso peroxidases y las lignina peroxidases forman la familia de las ligninasas. Las lacasas, llamadas también multicobre oxidasas por los átomos de Cu presentes en el centro catálico (responsables por su coloración azul característica) (Desai y Nityanand, 2011), actúan como principales oxidantes de compuestos aromáticos y no aromáticos relacionados a la lignina, con la concomitante reducción del O₂ a H₂O.

3 METODOLOGIA

Aislados: Se usaron 21 hongos de la Colección Fúngica del Laboratorio de Biología de la UNILA depositados según el PIBIC 2015/2016: “Aislamiento e Identificación de Hongos de la región del Parque Nacional de Iguazú – Paraná”, 10 provenientes de un área en recuperación ambiental hace más de 10 años (25°36'21" S 54°24'43" O) y 11 de un área impactada antropológicamente (25°37'17" S 54°26'46" O), a partir de los cuales también se hizo la “Avaliação Funcional de Fungos da Região do Parque Nacional do Iguazú – Paraná” (PIBIC 2015/2016). Se evaluó cualitativamente la actividad ligninolítica de 16 aislados, siendo que dos, oriundos del local en recuperación ambiental, presentaron dicha actividad. Para iniciar el presente proyecto, se reactivaron los 21 preservados en sus respectivos medios de aislamiento (PDA – Papa Dextrosa Agar o MA2 – Extracto de Malte 2%), a 28°C por 7 días.

Caracterización molecular y taxonómica de las comunidades fúngicas:

Se inoculó el micelio fresco (reactivado) en 10 mL de los medios de cultivo líquido PDA o MA2, respectivamente, por 7 días a 150 rpm. El ADN genómico de cada linaje se extrajo según el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985). Para la remoción del ARN, 1 µL de ARNasa fue colocado a la suspensión del ADN extraído y sometida a incubación a 37°C por 60 min. En gel de agarosa 1%, se estimó la concentración del ADN extraído al compararlo con concentraciones padrón; los resultados fueron fotodocumentados y los ADN congelados a -20°C. La región ITS1-5,8S-ITS2 fue amplificada según Bonugli-Santos et al (2010), usando los primers ITS1 y ITS4.

Evaluación confirmativa de la actividad de lacasa: Los hongos positivos en el test cualitativo fueron inoculados en 25 mL del medio líquido PDA, por 7 días a 150 rpm, en triplicatas. Al finalizar la incubación, se filtró el medio de cultivo para separar el micelio de la solución enzimática. La mezcla de la reacción (2mL), formada por 0.2mL de solución enzimática (R), 1.6mL de ABTS 0,03% (p/v) y 0.2mL de tampón acetato de sodio 0,1M (pH 0,5), se utilizó para evaluar la actividad de la lacasa usando espectrofotometría; siendo que, una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 umol de ABTS por min a 420nm (ϵ (coeficiente de absorción molar) $_{420}$: $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bourbonnais y Paice, 1988). Se midió la absorbancia (Abs) de la mezcla de reacción antes y después de su incubación a 36°C (baño María) por 10 min (t), para calcular la actividad enzimática mediante la fórmula

$$U / L = \Delta A_x \cdot 10^6 / \epsilon \cdot R \cdot t$$

4 RESULTADOS

Se obtuvo una amplificación eficiente de los 20 aislados viables al cultivo, pues el producto (banda) se posiciona en la región esperada (400 pb), mostrado por la flecha roja en la **Ilustración 1**. La amplificación de millares de veces de la región genética de interés permitirá la identificación de estos hongos al haber purificado y secuenciado el material genético.



Ilustración 1: Electroforesis del material amplificado (ejemplo). De izquierda a derecha padrón molecular, 1BB.7, 2BM.11, 2CB.5, 1BB.4

En la evaluación cuantitativa de la actividad de la lacasa apenas el hongo 1BB.1 presentó producción de la enzima, 0,96 UI/L. A pesar de que solo un hongo presentó actividad ligninolítica, el resultado es promisor pues apenas 20 hongos fueron evaluados. La actividad enzimática muestra que el hongo tiene la capacidad de producir la enzima inclusive sin el uso de inductores, ya que el ensayo fue realizado en un medio que contenía almidón como única fuente de carbono. Posiblemente en el ambiente natural, la presencia de inductores de la enzima podría tornar aún más eficiente su producción (Desai y Nityanand, 2011), no obstante, otros estudios con fuentes específicas para la producción de la enzima serán realizados con vista a su aplicación biotecnológica.

5 CONCLUSIONES

En esta etapa del proyecto, se logró un gran avance en la evaluación de la diversidad estructural de las comunidades fúngicas, una vez que el material genético está amplificado y listo para las próximas etapas de purificación y secuenciamiento; no obstante, es necesario continuar trabajando para caracterizarlas taxonómicamente. Por otro lado, a pesar del bajo número de aislados, se confirmó la producción de lacasa en el hongo 1BB.1, con 0.96 UI/L, constituyendo una muestra del potencial ligninolítico (funcional) y biotecnológico de la microbiota del PNI, siendo uno de los primeros estudios en este sentido.

6 PRINCIPALES REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDRIAN, P. **Fungal laccases – occurrence and properties**. Laboratory of Biochemistry of Wood-Rotting Fungi. Institute of Microbiology ASCR. Prague, Czech Republic, 2005.

BONUGLI-SANTOS, R. et al. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology** 114, 863-872, 2010.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.**, 255, 445-450 (Printed in Great Britain), 1988.

DESAI, S.; NITYANAND, C. Microbial Laccases and their Applications: A review. **Asian Journal of Biotechnology**, 3 (2): 98-124, 2011.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

SCHOBENHAUS, C et al. **Parque Nacional do Iguaçu, PR Cataratas de fama mundial**. Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos – SIGEP 11. Vol 2, 2002.