

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

FUNGOS AQUÁTICOS DO RIO TOCANTINS (IMPERATRIZ-MA): ABUNDÂNCIA, DIVERSIDADE E INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS.

SAMARA REIS GOVEIA¹, IVANEIDE DE OLIVEIRA NASCIMENTO²

MARCELO FRANCISCO DA SILVA³

^{1,2,3}Universidade Estadual Da Região Tocantina Do Maranhão - Centro De Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas - Rua Godofredo Viana, 1300 - Centro, cep: 65901-480, Imperatriz MA.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos apresentam grande diversidade de fungos e organismos zoospóricos, que juntamente às bactérias e aos detritívoros (insetos, protozoários, etc.) são responsáveis pela fragmentação e degradação de substratos orgânicos submersos, transformando-os em seus componentes originais (mineralização), dinamizando a cadeia de detritos e a ciclagem de nutrientes. Os estudos sobre fungos aquáticos no Maranhão existem, mas ainda são muito escassos, principalmente em Imperatriz, tais estudos são de suma importância para se conhecer a diversidade destes seres e a dinâmica de suas comunidades. Diante desse contexto, o presente trabalho analisou a qualidade da água do rio Tocantins no município de Imperatriz, e a identificação de fungos filamentosos aquáticos. As coletas da água foram realizadas em diferentes pontos do Rio Tocantins, nos meses de setembro a outubro de 2021(período seco) e nos meses de fevereiro (período chuvoso), junho (período seco) de 2022 e nos meses de janeiro a maio de 2023 (período chuvoso), com o uso de frascos de vidro esterilizados de 500 mL. Foi realizado o isolamento dos filamentos fúngicos através de filtração por membrana filtrante e a identificação clássica dos fungos, assim como os parâmetros de qualidade da água. As análises macro e microscopia dos fungos aquáticos isolados permitiu a identificação de 8 gêneros de fungos (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Alternaria* e *Aphanomyces*) e características das hifas e conídios dos fungos, importantes para identificação de espécies. As análises dos parâmetros da água mostraram que estes estão nos limites aceitáveis pelo CONAMA e recomendados pelo Ministério da Saúde. A partir da identificação molecular foram determinadas as espécies *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium rolsii*, *Trichoderma*sp pertencente ao clado Harzianum, *Cladosporium*sp, e *Fusarium incarnatum*. Conforme a identificação dos gêneros de fungos encontrados no Rio Tocantins, sete gêneros pertencem ao Filo Ascomycota, nota-se a presença de fungos comuns em solo, como o *Trichoderma* e *Fusarium*, este último pode causar fusariose em plantas. Pode se inferir que a presença desses fungos se dá devido ao desmatamento das margens do rio e com as enxurradas são carregadas para dentro do rio.

PALAVRAS-CHAVE: Ecossistema aquático; Identificação; Qualidade da água.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

INTRODUÇÃO

Os fungos estão distribuídos em diferentes ambientes, desde terrestre à aquático, a dispersão dos mesmos ocorre por meio da água, do ar, sementes, insetos, humanos e animais e deve-se a isso sua grande diversidade (Guerraet. *al*, 2011; Takahashiet. *al*, 2017).

O projeto aqui proposto foi fundamental para o monitoramento da qualidade da água e conhecimento da abundância, diversidade, bem como a influência das variáveis ambientais na população de fungos aquáticos no rio Tocantins na cidade de Imperatriz – MA. Tendo como objetivo investigar a diversidade e caracterizar espécies de fungos aquáticos no Rio Tocantins no município de Imperatriz-MA.

METODOLOGIA

A coleta da água foi realizada em 10 (dez) diferentes pontos do rio, com o uso de frascos de vidro esterilizados de 500mL. Em todas as coletas foram efetuados controles de viagem (frasco com 500mL de água estéril que acompanhou o deslocamento dos frascos na recolha das amostras) para controle de possível contaminação no processo de recolha. Após a coleta, os frascos foram transportados em caixa de isopor, com gelo, até o local de realização das análises. Antes das análises as amostras foram mantidas por um período máximo de 24h em um refrigerador com temperatura inferior a 10°C. Cada amostra foi analisada em triplicata (Filizola; Gomes; Souza, 2006; Faia, 2011; Ottoni; Yamaguchi, 2014).

Em cada ponto de coleta, os parâmetros físico-químicos: potencial hidrogeniônico (pH), temperatura da água (T), sólidos totais dissolvidos (TDS), turbidez (Turb), da região superficial do corpo hídrico, foram medidos no laboratório em função da pequena distância da coleta ao laboratório, utilizando-se sonda multiparâmetros marca Hidrolab modelo DS5, previamente calibrada antes de cada campanha de coleta. Foram também coletados dados de precipitação pluviométrica do município de Imperatriz, junto ao Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais.

Para o isolamento de fungos filamentosos, após filtração, as membranas foram transferidas para o meio de cultura BDA (Ágar, batata, desxtrose) suplementado com Cloranfenicol, na concentração de 30 mg/100 mL e as placas incubadas para favorecer o

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

crescimento de fungos em estufa de crescimento (B.O.D) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, para avaliação da diversidade fúngica e isolamento das culturas. As placas foram examinadas a partir do terceiro dia e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por 100 mL de amostra foram avaliadas até o décimo dia, baseando-se no aspecto morfológico das mesmas, procedendo-se a um registro diário do crescimento de colônias nas placas. Após crescimento, as placas foram conservadas a 4°C .

As colônias morfológicamente semelhantes foram isoladas por repicagens sucessivas e separadas em meio BDA (ágar, batata, dextrose) suplementadas com Cloranfenicol.

Após 5 e 7 dias de crescimento foi feito um registro fotográfico das características macroscópicas observadas. Características como rebordo, zonação ou rugosidade foram classificadas através da sua presença ou ausência no fungo filamentoso em estudo. Foram observadas ainda as características cor e textura. A textura foi definida de acordo com o livro “Food and Indoor Fungi”, e a cor definida após um processo de otimização.

As preparações microscópicas para visualização ao microscópio consistiram em retirar do rebordo da colônia uma amostra e colocá-la numa gota de azul de algodão (1g/L em ácido láctico 88%), entre lâmina e lamínula. Para visualização dos fungos filamentosos, cujas colônias não eram muito pulverulentas, utilizou-se a fita-adesiva, colocada sobre a colônia e transportada para a lâmina com uma gota de azul de algodão. E para a dispersão dos esporos foi utilizada uma gota de álcool 98% na lâmina, para dispersão dos esporos.

Após o isolamento e obtenção de culturas puras foi realizada a extração de DNA total com a utilização do kit Extração DNEASY Plant mini kit (Pró-análise), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, realizou-se a amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), da região correspondente ao espaçador interno transcrito (ITS) ITS1 – 5,8S – ITS2. Para a amplificação da região ITS, foi utilizado 30 mg de DNA total, e adicionou-se 5 μL de tampão 5X; 0,3 μL de GoTaq DNA Polimerase (5U/ μL) (Promega); 0,5 μL de dNTP (10 mM); 0,5 μL de cada primer (10 μM) e água mili-Q para completar o volume de reação (25 μL). Em seguida essa mistura foi submetida à amplificação com o ciclo: etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 10 minutos. Foram utilizados os *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 5F2, Cal 235f, BT2A e EF1 728f segundo

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

White et al.(1990).

As amostras amplificadas foram submetidas ao sequenciamento e os eletroferogramas foram utilizados para construção de *contigs* e montagem final de cada sequência, com auxílio de softwares de bioinformática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados a quantidade de sais dissolvidos nos diferentes pontos de coleta nos períodos seco e chuvoso são semelhantes, o teor de sólidos totais (TDS) nos pontos de coleta 1,2,3,5,6,9 e 10 foram maiores no período chuvoso. Os valores de turbidez foram maiores no período chuvoso em todos os pontos, com exceção do ponto 2. Quanto à condutividade, nos pontos 1,2,5,6 e 9 os valores foram maiores no período chuvoso,e para os pontos 3,4,7,8 e 10 os valores foram maiores no período seco (Tabela 1) .

Tabela 1. Parâmetros de qualidade das amostras de água coletadas no Rio Tocantins

	Período seco				Período chuvoso			
	TDS (g L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	SAL (PPT)	CON D(us/cm)	TDS (g L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	SAL (PPT)	COND(us/cm)
ponto 1	0,038	27,5	0,02	47	0,311	30,1	0,01	53,2
ponto 2	0,036	40	0,01	46	0,051	34,8	0,02	46,8
ponto 3	0,01	36,3	0,01	51,3	0,032	38	0,02	41,4
ponto 4	0,031	32,2	0,02	50	0,031	38,1	0,01	46,6
ponto 5	0,03	25,7	0,01	43	0,133	32,1	0,01	46,7
ponto 6	0,031	27,2	0,01	47	0,067	31,4	0,01	59,1
ponto 7	0,031	23,7	0,01	49	0,029	41,6	0,03	44,3
ponto 8	0,034	22,4	0,01	54,1	0,033	35	0,03	38,3
ponto 9	0,035	21,4	0,02	42,1	0,177	29	0,01	45,4
ponto 10	0,022	26	0,01	60,2	0,035	28	0,01	52,3

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

No Rio Tocantins o teor sólidos totais (TDS) está nos padrões adequados, variaram de 0,0001 a 0,0414 g.L-1 (equivale a 0,1 a 41,4 mg.L-1), visto que a Portaria MS nº 2914/2011, estima que o padrão para consumo humano aceitável da presença dessas substâncias na água é de até 1000 mg/L. Já a Resolução nº 357 de 2005, do Ministério do Meio Ambiente, determina que o padrão indicado para consumo humano deve ser menor que 500 mg/L.

Os valores de turbidez para as amostras de água do Rio Tocantins, varia de 21,1 a 43,0 UNT (esse valor foi observado, somente em um único ponto na coleta 1), concorda com a Resolução CONAMA nº 357/2005, onde os valores de turbidez para rios de classe I, não devem ultrapassar valores acima de 40 NTU.

Os parâmetros ambientais do Rio Tocantins influenciaram no número de colônias fúngicas, observou-se maior quantidade de colônias de fungos aquáticos no período seco e quente, no qual se quantificou menor teor de sólidos totais e turbidez, e maior condutividade nos pontos de coletas 3,4,7,8 e 10 (Tabela 1 e 2).

Tabela 2. Número de colônias de fungos aquáticos encontradas nas amostras de água do Rio Tocantins.

Período seco	Nº colônias	Período chuvoso	Nº colônias
Espécie		Espécie	
Aspergillusflavus	2	Aspergillusflavus	1
Aspergillusniger	3	Aspergillusniger	1
Fusariumsp	2	Fusariumsp	1
Peniciliumsp	6	Peniciliumsp	1
Trichordema	6	Trichordema	2
cladosporumsp	2	cladosporumsp	0
curvulariasp	1	curvulariasp	0
Alternaria sp	2	Alternaria sp	0

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Aphanomuces sp.	2	Aphanomuces sp.	0
Penicilliumrolfsii	3	Penicilliumrolfsii	0
Aspergillus sp.	4	Aspergillus sp.	1
Fusariumincarnatum	4	Fusariumincarnatum	0
Penicilliumexpansum	1	Penicilliumexpansum	0
TOTAL COLÔNIAS	38		7

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Quanto à identificação molecular dos fungos isolados do rio Tocantins, foram identificadas as espécies *Aspergillusflavus*, *Penicilliumexpansum*, *Penicilliumrolfsii*, *Trichoderma*sp pertencente ao cladoHarzianum, *Cladosporium*sp, e *Fusariumincarnatum*. São espécies sem estudos certos em bacias próximas ao rio Tocantins, mas que tiveram ocorrência no rio e já foram descritas em trabalhos de Takahashi (2009), em um estudo de fungos em águas do Parque Municipal do Ibirapuera, em São Paulo

O gráfico 1 apresenta os valores do índice de diversidade de Shannon (H') dos períodos. Observa-se maior diversidade de espécies no período seco, período de baixa precipitação, quente.

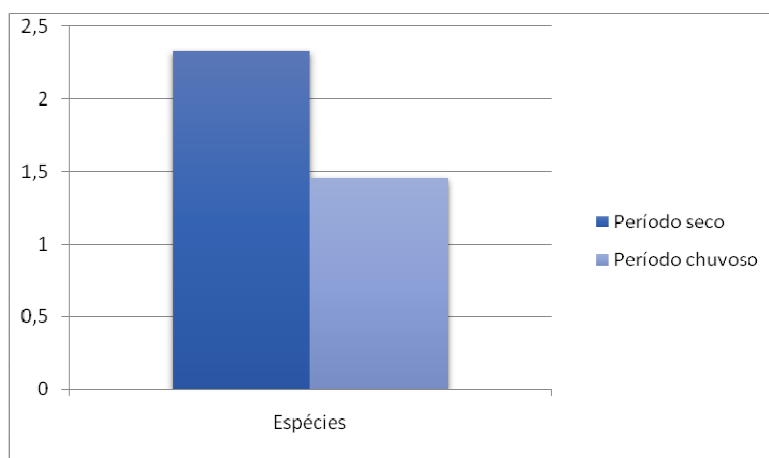


Gráfico 1. Índice de diversidade de Shannon (H') dos períodos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

O Gráfico 2 apresenta os gêneros de fungos e suas frequências de ocorrência em todos os pontos de coletas realizadas no Rio Tocantins. Observa-se que o gênero *Alternaria* e *Aphanomyces* são consideradas espécies raras e não há espécie dominante para o estudo realizado no Rio Tocantins.

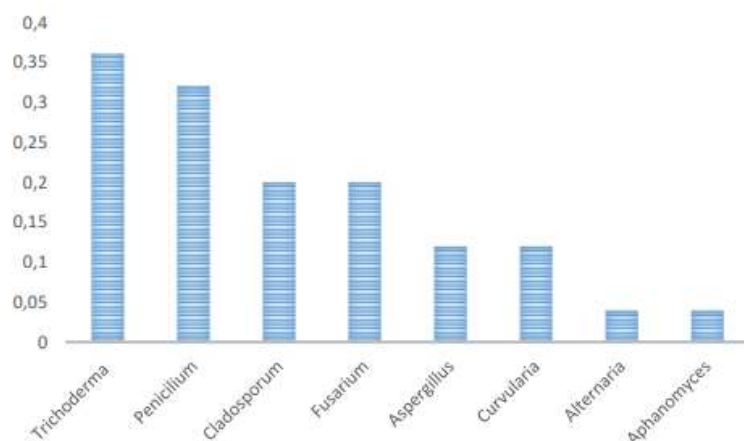


Gráfico 2. Frequência de ocorrência dos fungos identificados no Rio Tocantins.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O índice de diversidade de fungos aquáticos foi mais elevado durante o período seco (Tabela 2 Gráfico 1). Os fungos do gênero *Trichoderma* e *Penicillium* são espécies comuns em todos os pontos de coleta, as espécies *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Curvularia* são classificados como mais comum, enquanto as espécies *Alternaria* e *Aphanomyces* é tida como rara (Gráfico 2). Com isso permitiu a identificação de 8 gêneros de fungos (*Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Alternaria* e *Aphanomyces*).

CONCLUSÕES

As análises físico-químicas dos parâmetros de qualidade da água do Rio Tocantins constatarem que a água pertence à Classe I, a qual é destinada ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho); d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e sejam ingeridas cruas sem remoção de película; à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana, estando nos limites determinados nas Resoluções do CONAMA (2011) e recomendado pelo Ministério da Saúde. Contudo, se faz necessário a continuidade da pesquisa com abrangência de pontos e coletas que promovam maior segurança.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Os parâmetros ambientais do Rio Tocantins influenciaram no número de colônias fúngicas, observou-se maior quantidade de colônias de fungos aquáticos no período seco e quente, no qual se quantificou menor teor de sólidos totais e turbidez.

Conforme a identificação, os fungos pertencem aos gêneros: *Trichoderma*, *Penicilium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Alternaria* e *Aphanomyces*, sete pertencem ao Filo Ascomycota, nota-se a presença de fungos comuns em solo, como o *Trichoderma* e *Fusarium*. Pode se inferir que a presença desses fungos se dá devido ao desmatamento das margens do rio e com enxurradas sendo carregados para dentro do rio.

A partir da identificação molecular foram determinadas as espécies *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium rolsii*, *Trichoderma sp* pertencente ao clado Harzianum, *Cladosporium sp*, e *Fusarium incarnatum*.

APOIO FINANCEIRO

Agradecimento ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho CONAMA.

Faia, A.M. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água**. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia). Universidade de Lisboa. Lisboa, 2011.

Guerra, R. A. T. et al. **Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas**. Caderno Cb virtual 2, João Pessoa: Universitária, 2011, 610p.

Filizola, H. F.; Gomes, A.F.; Souza, M.D. **Manual de amostra em área agrícola para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

Otoni, L.C.C.; Yamaguchi, J.O.; Yamaguchi, N.U. Ocorrência de fungos em água para consumo humano. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, 2014, 10:18, . 3426.

Takahashi, Juliana Possatto. Diversidade de geofungos em águas do Parque Municipal do Ibirapuera na cidade de São Paulo, SP, Brasil. 2009.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. L.; WHITE, T. J. (eds). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, p. 315-322, 1990.