



Isolamento e seleção de fungos celulósicos provenientes de solo de mata atlântica.

Felipe Alexandre Tenório⁽¹⁾; João Manoel da Silva⁽¹⁾; Erica Lívea Ferreira Guedes⁽³⁾; Tania Marta Carvalho dos Santos⁽²⁾; Ludmilla Santos de Albuquerque⁽⁴⁾; Ana Lígia Silva de Melo⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Acadêmico do Curso de Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, CEP 57100-00, Rio Largo, AL, felipetenorio@hotmail.com ;

⁽²⁾ Professora Orientadora CECA/Universidade Federal de Alagoas, CEP 57100-00, Rio Largo, AL;

⁽³⁾ Mestranda em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de Alagoas, CEP 57309-005, Arapiraca, AL;

⁽⁴⁾ Doutoranda do Renorbio- CECA/Universidade Federal de Alagoas, CEP 57100-00, Rio Largo, AL.

RESUMO: Com o presente trabalho, objetivou-se selecionar cepas de fungos isolados de solo de mata atlântica, com potencial de produção de celulase. Foi feita a coleta de solo numa área demarcada de 50m², onde as amostras foram coletadas em “zig-zag” a uma profundidade de 0-20 cm, acondicionadas em saco plástico e levadas ao laboratório. A atividade de produção de celulase foi determinada preliminarmente com meio de cultura CMC com papel filtro, onde nove dos onze isolados apresentaram crescimento na superfície do papel. Posteriormente, os fungos selecionados foram inoculados em meio de cultura Celulose Ácidos para produção de halo de hidrólise. Foram obtidas 3,22x10² UFCg⁻¹, meio de Martin dos quais nove isolados apresentaram a capacidade de crescimento em meio de cultura, onde a única fonte de carbono a produção foi a celulose, dentre estes oito formaram halo de hidrólise.

Termos de Indexação: carboximetilcelulose, celulose, mata atlântica.

INTRODUÇÃO

A celulose é considerada como uma das únicas fontes renováveis de carbono, além de ser disponível em grandes quantidades em resíduos celulósicos, representando mais de 60% dos resíduos agrícolas. Estima-se que a produção anual de celulose atinja a casa dos 100 bilhões de toneladas. A celulose é hidrolisada enzimaticamente pela celulase, que não corresponde a uma única enzima, mas a ação sinérgica de endoglucanases e exoglucanases sintetizadas por microrganismos (BAYER e LAMED, 1992; VALENZUELA *et al.*, 2001).

Os fungos celulósicos vivem, em sua maior parte, no solo e em restos de matéria orgânica,

como a serrapilheira sendo desta forma, um dos responsáveis por sua decomposição. Estes microorganismos possuem a capacidade de degradar moléculas como celulose e lignina através da ação de enzimas produzidas pelo próprio fungo. Tais enzimas possuem grande aplicação industrial.

A degradação microbiana da celulose é total e específica, e tem estimulado o uso dos processos de fermentação celulósica pelo homem (Linchy *et al.*, 1981). A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (Bayer e Lamed, 1992). Muitos estudos continuam encontrando mais aplicações econômicas para esse resíduo celulósico nativo, o qual apresenta 60% de todo resíduo agrícola. A maioria desses resíduos é utilizada como ração animal ou queimada como fonte de energia (Kansoh *et al.*, 1999).

As celulasas são enzimas de importância econômica e são vendidas em grandes volumes tendo diferentes aplicações industriais, como por exemplo, no processamento do amido, produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de suco de frutas e vegetais polpa, indústria de papel e indústria têxtil (Ogel *et al.*, 2001).

Dentro deste contexto, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o potencial celulósico de fungos isolados de solo de Mata Atlântica nativa.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Geral, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas na cidade de Rio Largo-AL situada a 9° e 29'45" de latitude sul, 35° e 49'54," de longitude oeste e 165 m de altitude. Pela classificação de Köppen, a área de estudo enquadra-se no tipo climático As', é tropical litorâneo úmido, com sol nos meses de



setembro até maio, da primavera até o verão, com temperatura variando em torno de 19°C à 32°C, com chuva e temporais nos meses de junho até agosto, do outono até o inverno, com temperaturas variando em torno de 15°C à 26°C. A umidade relativa do ar é de 79,2% e o índice pluviométrico é 1.410 mm/ano. Para o isolamento dos fungos, foi feita a coleta de solo numa área demarcada de 50m², onde as amostras foram coletadas em “zig-zag” a uma profundidade de 0-20 cm e acondicionadas em saco plástico e levadas ao laboratório. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em uma bandeja e posta para secar a temperatura ambiente por 24 horas. Passado esse período, foi pesada uma amostra de 10g de solo e colocada em erlenmeyer contendo 90mL de solução salina e agitado por 30 minutos para diluição seriada decimal de 10⁻¹ a 10⁻⁴. Aliquotas de cada diluição foram pipetadas e distribuídas com auxílio da alça de Drigalski em placa de Petri, contendo Meio de Martin. Após cinco dias de incubação em temperatura ambiente as colônias foram isoladas em meio de BDA (Batata Dextrose Agar) com sucessivas repicagens até obtenção de colônias puras.

A seleção quanto à capacidade celulósica dos isolados, foi feita utilizando o meio C.M.C. (celulose microcristalina), em tubos de ensaio foi colocado uma tira de papel de filtro esterilizado medindo 7,0 x 1,0 cm de modo que a tira ficou em média a 2,0 cm acima do nível do meio. As culturas foram incubadas na sala de câmara de fluxo a 28°C por 37 dias. A estimativa do número de isolados celulolíticos por meio da utilização de tabela do número mais provável.

Foi utilizada um meio de cultivo para crescimento de microrganismos celulósica contendo 0,5 g de NaNO₃, 1,0 g de K₂HPO₄, 0,5 g de KCl e 0,5 g de MgSO₄, completando o volume para 1000 mL de água destilada.

Os isolados que apresentaram potencial celulósico foram avaliados para produção de celuloses totais, utilizando-se a técnica de formação de halo de degradação. Os isolados foram incubados em tubos de ensaio de 15 x 2,5 cm contendo o meio de celulose ácida, incubados a 28°C.

Os halos de hidrólise foram medidos em profundidade, os quais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a análise de médias pelo teste de Scott-Knott P (<0,05) pelo o software estatístico SISVAR@versão 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos em meio de Martin 3,22x10² UFCg⁻¹, dos quais nove isolados apresentaram a característica básica, isto é, capacidade de crescimento em meio de cultura, onde a única fonte de carbono foi a celulose, selecionados pelo método preliminar em papel filtro como mostrado na (Figura 1).

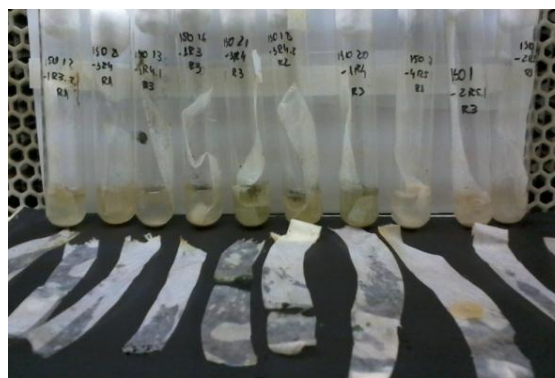


Figura 1 - Seleção preliminar da produção de celulase em papel filtro.

Oito apresentaram a produção de halo de hidrólise (Figura 2), fazendo com que a ação enzimática altere a cor do meio de cultura do opaco ao translúcido.

Com relação halo de hidrólise, a análise de variância (Tabela 1) detectou diferenças significativas entre os isolados.

Tabela 1. Quadrados médios e coeficiente de variação obtidos da análise de variância para halo por profundidade em tubos de ensaio, em meio de celulose ácida.

Fonte de variação	GL	QM	F
Isolados	7	1.098	0.0011**
Repetição	2	0.315	0.1731
Erro	14	0.158	
CV (%)		25,13	

** Significativo P(<0,01)

Conforme se verifica na figura 3 os melhores resultados foram obtidos para os isolados 1 e 7, que não diferiram significativamente entre si.

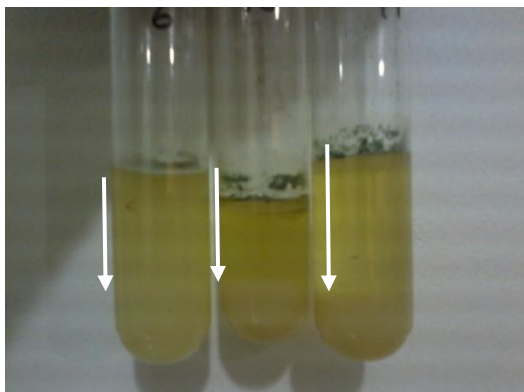


Figura 2 - Produção do halo de hidrólise em profundidade.

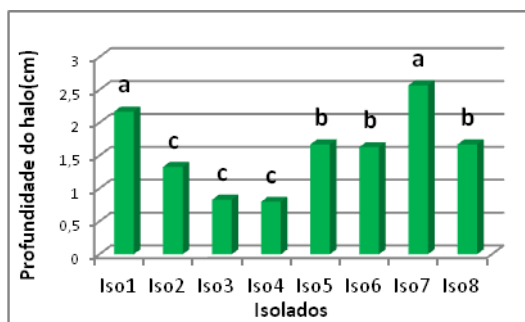


Figura 3 - Médias de halo por profundidade produzidas em meio de celulose ácida em tubos de ensaio, por isolados de fungos filamentosos

(LYND et al., 2002; BHAT; BHAT, 1997).

O interesse nos fungos filamentosos se deve a sua capacidade de decompor diferentes substratos, que é explorada gerando produtos ou processos, como o isolamento de enzimas, a biodegradação de resíduos e fermentação em estado sólido de resíduos (GRIMM et al., 2005, MARQUES, 2010).

CONCLUSÃO

Os melhores resultados de produção de celulase foram obtidos pelos isolados 1 e 7.

REFERÊNCIAS

BAYER, E. A.; LAMED, R. The Celulose Paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable resource? **Biodegradation** v.p.3, 171-188, 1992.

BHAT, M.K.; BHAT, S.. *Clostridium thermocellum* cellulosome: dissociation, isolation and characterisation of subunits and the potential biotechnological implications. In: PANDALAI SG, editor. Recent Research Developments in Biotechnology and

Bioengineering, Vol. 1. Part-I, Trivandrum, India; Research Signpost, 1998. pp. 59–84.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

KANSOH, A.L., ESSAM, S.A., ZEINAT, A.N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Thichoderma reesei*. **Journal of Polymer Science**, v. 62, p. 273-278, 1999.

LYNCH, J.M., ALATER, J.H., BENNET, J.A., HARPER, S.H.T., Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. **Journal of General Microbiology**, v. 127 p. 231-236, 1981.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MARQUES, M. P. Estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por fungos filamentosos. Araraquara, 2010, 77f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual Paulista.

ÖGEL, Z.B.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. **Enzyme and Microbial Technol**, v.28, p.689–695, 2001.

VALENZUELA, E.; LEIVA, S.; GODOY, R. Variación estacional y potencial enzimático de micro hongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 74, p.737-749, 2001.