

# ATIVIDADES DEGRADATIVAS DE CELULOSE E DE FENÓIS POR FUNGOS ISOLADOS DE ACÍCULAS DE *Pinus taeda*

Celso Garcia Auer<sup>1</sup>, Tania Amaro<sup>2</sup>, Ida Chapaval Pimentel<sup>3</sup>, Patrícia do Rocio Dalzoto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Eng. Florestal, Dr., EMBRAPA Florestas, Colombo, PR, Brasil - celso.auer@embrapa.br

<sup>2</sup>Bióloga, Curitiba, PR, Brasil - taniaamaro@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, Dr<sup>a</sup>., Depto. de Patologia Básica, UFPR, Curitiba, PR, Brasil - ida@ufpr.br

<sup>4</sup>Bióloga, Dr<sup>a</sup>., Depto. de Patologia Básica, UFPR, Curitiba, PR, Brasil - pdalzoto@ufpr.br

Recebido para publicação: 09/11/2011 – Aceito para publicação: 20/01/2014

## Resumo

Oito fungos isolados de acículas de *Pinus taeda* em decomposição, da região de Três Barras, SC, Brasil, foram analisados quanto ao potencial de degradarem celulose e lignina. Utilizou-se a técnica de coloração com vermelho congo em meio carboximetilcelulose-ágar (CMCA) para a presença de celulase, e o teste de Bavendamm em meio extrato de malte-ácido tânico-ágar (EMATA) para a presença de fenoloxidase. *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. produziram maior atividade em meio CMCA, enquanto que *Trichoderma* sp., *Pestalotia* sp., *Exophiala* sp. e *Phomopsis* sp. produziram maior atividade em meio EMATA. Os fungos *Stachybotrys* sp. e *Rhizopus* sp. se desenvolveram em CMCA e EMATA, mas não apresentaram atividade, indicando que não possuem capacidade para degradar celulose ou fenóis em acículas de pinus.

**Palavras-chave:** Decomposição; fisiologia de fungos; serapilheira.

## Abstract

*Degradative activities of cellulose and phenols by fungi isolated from Pinus taeda needles.* Eight fungi isolated from *Pinus taeda* needles under decomposition, from Três Barras region, SC, Brazil, were analyzed in relation to their ability to degrade cellulose and lignin. The staining technique employed congo red on carboxymethylcellulose-agar (CMCA) for cellulose and the Bavendamm test employed malt extract-tanic acid-agar (EMATA) for phenol oxidase. *Aspergillus* sp. and *Cladosporium* sp. produced higher activity in CMCA environment, while *Trichoderma* sp., *Pestalotia* sp., *Exophiala* sp. and *Phomopsis* sp. produced higher activity in EMATA environment. The fungi *Stachybotrys* sp. and *Rhizopus* sp. developed in CMCA and EMATA environment, but without noticeable activities, which indicates inability in order to degrade cellulose or phenols in pine needles.

**Keywords:** Decomposition; fungal physiology; litter.

## INTRODUÇÃO

A serapilheira depositada na superfície do solo apresenta quantidades significativas de nutrientes, que retornam ao solo após a sua decomposição e são absorvidos novamente pelas árvores. Em um bosque, as folhas constituem a principal fonte de nutrientes para a vegetação, fauna e microrganismos. Cerca de 80% da degradação das folhas são realizados por microrganismos, sendo os fungos um dos principais agentes (JENSEN, 1974).

A função mais importante da microbiota do solo é degradar materiais orgânicos e liberar CO<sub>2</sub> à atmosfera e nutrientes minerais. A biodegradação dos materiais lignocelulósicos é um evento importante no processo de ciclagem do carbono, devido à abundância desses materiais na maioria dos ecossistemas terrestres. Basicamente, esses materiais são compostos de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, sem falar nos extrativos (lipídeos, proteínas e sais minerais), que podem variar entre 1 e 5% (SALIBA *et al.*, 2001). Celulose, hemicelulose e lignina são os componentes mais importantes das folhas, formando uma intrincada rede de fibras, constituindo de 50 a 80% da sua matéria seca (TAUK, 1990).

A serapilheira de coníferas é decomposta principalmente por fungos sob condições oxidativas (MILLAR, 1974; DONNELLY *et al.*, 1990). A principal função desses microrganismos no solo é a

degradação da celulose e da lignina, gerando subprodutos e biomassa proteica que servirão de alimento para outros organismos (ROITMAN *et al.*, 1991). Essa decomposição auxilia a ciclagem dos nutrientes, os quais serão novamente absorvidos pelas raízes e permitirão um bom estado nutricional das acículas de pinus (REISSMANN; WISNIEWSKI, 2000).

Os estudos sobre a decomposição de acículas de pinus e a população de fungos atuantes nesse processo ainda são incipientes no Brasil. Um estudo pioneiro sobre a população de fungos associados com acículas de *Pinus taeda* em decomposição revelou a presença de vários fungos celulolíticos (GHIZELINI, 2005). A próxima etapa desse estudo seria analisar a participação individual de cada fungo no processo da degradação das acículas, para confirmar a liberação de celulases e ligninases por esses microrganismos. Assim, este trabalho apresenta uma avaliação das atividades celulolíticas e lignolíticas *in vitro* de fungos isolados de acículas de *Pinus taeda* em decomposição.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados utilizados no presente estudo foram obtidos por Ghizelini (2005) de acículas de *Pinus taeda* coletadas na região de Três Barras, situada no estado de Santa Catarina, localizado à latitude de 26°07' S, longitude 50°19' W e altitude de 775 m acima do nível do mar. Oito gêneros de fungos foram escolhidos para o estudo: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Exophiala* sp., *Pestalotia* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizopus* sp., *Stachybotrys* sp. e *Trichoderma* sp. Os fungos foram cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar comercial, 39 g, água destilada, 1000 mL) para a produção de inóculo, em temperatura ambiente, até a inoculação em meio específico para celulolíticos e lignolíticos.

A metodologia empregada por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) para avaliar a atividade enzimática da celulase extracelular de fungos filamentosos em meio sintético agarizado com carboximetilcelulose (CMCA) como única fonte de carbono foi escolhida para este estudo. Os isolados foram cultivados em meio ágar-CMC ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g.L<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g.L<sup>-1</sup>; asparagina, 0,5 g.L<sup>-1</sup>; KCl, 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g.L<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 0,5 g.L<sup>-1</sup>, carboximetilcelulose, 10,0 g.L<sup>-1</sup>; ágar, 20,0 g.L<sup>-1</sup>; água destilada, 1000 mL). As placas foram inoculadas com discos de micélio-ágar de 5 mm, retirados das culturas puras em meio BDA e incubadas por 7 dias a 25 °C. Em seguida, as culturas foram submetidas a choque térmico por 16 h a 50 °C. Para observar a atividade celulolítica, as culturas foram recobertas com 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g.L<sup>-1</sup> em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0) e após 30 min. a solução foi descartada e as culturas foram lavadas, por duas vezes, com 5 ml de solução de NaCl 0,5 M.

A metodologia utilizada para evidenciar a atividade lignolítica de fungos isolados de madeira de eucalipto foi baseada em estudo de Castro e Krünger (1984), com base em meio extrato de malte-ácido tânico-ÁGAR (EMATA: extrato de malte, 15,0 g.L<sup>-1</sup>; ácido tânico, 5,0 g.L<sup>-1</sup>; ágar, 20,0 g.L<sup>-1</sup>). O método se baseia na produção de oxidase extracelular observada pelo reverso da placa, que reage com o ácido tânico e escurece o meio (NOBLES, 1965). Para sua elaboração, ágar e extrato de malte são adicionados a 850 mL de água destilada em um frasco de Erlenmeyer, enquanto que 150 mL de água destilada são colocados em outro frasco em separado, ambos esterilizados em autoclave por 15 min a 120 °C. Após a autoclavagem, adicionam-se os 5 g de ácido tânico nos 150 mL de água destilada estéril a quente e depois reúne-se com os 850 mL de ágar-extrato de malte (TUIITE, 1969). A avaliação é baseada no teste de Bavendamm quanto à formação de um halo marrom, considerado como reação positiva para produção de fenoloxidasas (NOBLES, 1965).

Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os fatores determinantes que viabilizam essa seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos microrganismos (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996). No presente trabalho, foram medidos os diâmetros e, posteriormente, foi calculada em cada substrato a divisão do diâmetro da colônia com o halo pelo diâmetro da colônia.

O delineamento utilizado foi com oito fungos, dois diâmetros e quatro repetições (placas). Os dados de diâmetro do halo e da colônia e o índice enzimático de cada isolado foram transformados para  $\log(x + 2)$ , e a análise estatística foi feita com o programa Assistat versão 7.5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos que apresentaram o maior índice enzimático com o método da coloração com vermelho congo em meio CMCA foram *Aspergillus* sp., *Exophiala* sp., *Cladosporium* sp. e *Pestalotia* sp. (Tabela 1). Porém, pela visualização das colônias, *Trichoderma* sp., *Phomopsis* sp., *Pestalotia* sp.,

*Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. produziram os maiores diâmetros de halo. Foi observada a formação de um halo claro ao redor das colônias e uma forte pigmentação do micélio, indicando produção de celulase no meio de cultura (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996). A aplicação do choque térmico (50 °C) por 16 horas auxiliou a revelação do halo de degradação da celulose, pois, de acordo com Montenecourt e Eveleigh, citados por Nogueira e Cavalcanti (1996), o choque térmico favorece uma hidrólise mais rápida da celulose, permitindo a seleção de colônias produtoras de enzimas celulolíticas termoestáveis. O surgimento do halo deve-se ao efeito combinado do aumento da atividade celulolítica e de uma consequente inibição do crescimento do fungo. Segundo esses autores, isso poderia ser devido à liberação de celulases das hifas localizadas nos bordos das colônias por autólise resultante do tratamento térmico. Segundo Teather e Wood, citados por Nogueira e Cavalcanti (1996), a interação do vermelho congo com polissacarídeos ( $\beta$ -D-glucanas) contendo ligações  $\beta$ (1-4) ou  $\beta$ (1-3) dão um complexo vermelho intenso. Se houver a presença de  $\beta$ -glucanases no meio de cultura, essa coloração vermelha intensa não é formada.

Tabela 1. Atividade celulolítica e lignolítica de fungos isolados de acículas *Pinus taeda* em decomposição, cultivados em meio carboximetilcelulose-ágar (CMCA) e extrato de malte-ácido tânico-ágar (EMATA), por sete dias a 25 °C.

Table 1. Cellulolytic and lignolytic activity of fungi isolated from *Pinus taeda* needles under decomposition, grown in carboxymethylcellulose-agar (CMCA) and malt extract-tanic acid-agar (EMATA), for seven days under 25 °C.

Fungo	Meio CMCA			Meio EMATA			Coloração do reverso da placa**
	Diâmetro (mm)		Índice enzimático*	Diâmetro (mm)		Índice enzimático*	
	Colônia	Halo		Colônia	Halo		
<i>Aspergillus</i> sp.	25,0e	42,0c	1,7a	31,0d	34,4d	1,1bc	C
<i>Cladosporium</i> sp.	26,1e	37,0d	1,4bc	21,6e	27,2e	1,3bc	E
<i>Exophiala</i> sp.	19,1f	30,5d	1,6ab	56,7b	58,0b	1,0c	E
<i>Pestalotia</i> sp.	48,9d	64,0b	1,3c	65,0b	66,2a	1,0c	E
<i>Phomopsis</i> sp.	60,0c	65,4b	1,1d	39,6c	41,6c	1,0c	E
<i>Rhizopus</i> sp.	90,0a	0,0f	0,0e	90,0a	0,0g	0,0d	SC
<i>Stachybotrys</i> sp.	15,2g	16,7e	1,0d	15,7f	20,7f	1,3bc	C
<i>Trichoderma</i> sp.	68,6b	76,6a	1,1cd	42,6c	69,0a	1,6a	E

Cada valor é média de 4 repetições. \*O índice enzimático é a relação diâmetro da colônia mais halo de degradação/diâmetro da colônia. \*\*Coloração no reverso de placas com meio EMATA: SC: sem escurecimento do meio; C: coloração clara; E: coloração escura.

A literatura apresenta conclusões contraditórias em relação ao uso do índice enzimático e a provável atividade enzimática presente. Num estudo semelhante, Nogueira e Cavalcanti (1996) observaram em 48 linhagens de fungos isolados de aveia industrializada que colônias com menor diâmetro apresentavam maiores valores de atividade da celulase. Da mesma forma, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) relataram que algumas colônias com pouco crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos. Em outro estudo, De Oliveira *et al.* (2006) relataram que a produção extracelular de amilase, lipase, pectinase e protease de isolados de rizóbia é maior quanto maior for o índice calculado. Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) concluíram, com base em seus estudos, que o valor do índice enzimático não foi um parâmetro adequado de avaliação na tentativa de comparar atividades entre diferentes linhagens, mas que seria uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido para selecionar mutantes.

No presente estudo, *Cladosporium* sp., *Stachybotrys* sp. e *Trichoderma* sp. foram os fungos que produziram os maiores índices enzimáticos no meio ácido tânico. Contudo, *Trichoderma* sp. e *Pestalotia* sp. foram diâmetros significativamente maiores de halo e maior escurecimento do meio, e seriam os fungos de maior atividade lignolítica. Por esse ponto de vista, a conclusão feita por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) de que o valor do índice enzimático pode não ser um parâmetro adequado é válida. Para avaliar linhagens, também é necessário analisar a coloração da placa no sentido de detectar a oxidação dos fenóis do meio malte-ácido tânico.

Os fungos que obtiveram os maiores índices enzimáticos com o método do meio EMATA foram *Trichoderma* sp., *Stachybotrys* sp. e *Cladosporium* sp. (Tabela 1). No entanto, observando-se as colônias, *Trichoderma* sp., *Pestalotia* sp., *Exophiala* sp. e *Phomopsis* sp. apresentaram maior diâmetro de halo, assim como maior escurecimento do meio.

Houve preferência de meio de cultura para o desenvolvimento dos fungos em estudo. A relação meio CMCA/meio EMATA (Tabela 2) revelou que o crescimento de *Cladosporium* sp., *Phomopsis* sp. e *Trichoderma* sp. foram melhores em meio com CMCA. Outro grupo formado por *Aspergillus* sp., *Exophiala* sp., *Pestalotia* sp. e *Stachybotrys* sp. desenvolveu-se melhor em meio com ácido tânico (Tabela 2), apesar de que *Aspergillus* sp. apresentou o maior índice enzimático no meio com carboximetilcelulose.

Tabela 2. Relação de crescimento de fungos isolados de acículas *Pinus taeda* em decomposição, em meio com carboximetilcelulose (CMCA) e ácido tânico (EMATA).

Table 2. Growth relation of fungi isolated from *Pinus taeda* needles under decomposition, on media with carboxymethylcellulose (CMCA) and malt extract-tanic acid (EMATA).

Fungo	Diâmetro da colônia (mm)		Relação CMCA/EMATA	Preferência*
	CMCA	EMATA		
<i>Aspergillus</i> sp.	25	31	0,81	AT
<i>Cladosporium</i> sp.	26,1	21,6	1,21	CMC
<i>Exophiala</i> sp.	19,1	56,7	0,34	AT
<i>Pestalotia</i> sp.	48,9	65	0,75	AT
<i>Phomopsis</i> sp.	60	39,6	1,51	CMC
<i>Rhizopus</i> sp.	90	90	1,00	independe
<i>Stachybotrys</i> sp.	15,2	15,7	0,97	AT
<i>Trichoderma</i> sp.	68,6	42,6	1,61	CMC

\* AT: ácido tânico; CMC: carboximetilcelulose.

O fungo *Rhizopus* sp. cresceu igualmente nos dois meios, sem apresentar algum tipo de reação enzimática. Esse fungo deve ter utilizado os componentes do meio CMCA (sais minerais, asparagina e extrato de levedura) e do meio EMATA (extrato de malte) para o seu desenvolvimento, sem precisar degradar carboximetilcelulose ou ácido tânico.

Esse estudo revelou que cada fungo pode participar especificamente do processo de decomposição das acículas, atacando preferencialmente aqueles compostos orgânicos para os quais possivelmente possui enzimas degradativas. Como existe uma boa relação entre o uso de carboximetilcelulose *in vitro* e a degradação da celulose (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004) e do uso de ácido tânico *in vitro* e a degradação de lignina (NOBLES, 1965), espera-se que a ação decompositora desses substratos seja efetivada pelos fungos estudados. Os fungos isolados de acículas podem degradar carboximetilcelulose e/ou ácido tânico, porém alguns fungos, como é o caso de *Rhizopus* sp., não possuiriam capacidade de degradar celulose ou lignina, pela incapacidade de utilizar a carboximetilcelulose ou mesmo o ácido tânico como substratos ao crescimento.

A correlação entre os dados de índice enzimático em meio CMCA e em meio EMATA da Tabela 1 mostrou-se negativa ( $r = -0,47$ ), indicando que os fungos devem ser mais ativos em um dado substrato, em detrimento de outro. Assim, a ocorrência de diversos grupos fúngicos, cada um com habilidades saprofitas específicas, durante a decomposição das folhas, pode resultar em um processo conhecido como sucessão fúngica (SCHOENLEIN-CRUSIUS; MILANEZ, 1998) e que deve ser importante para a decomposição da acícula.

Estudos complementares serão desenvolvidos para determinar o efeito do crescimento de cada fungo diretamente sobre as acículas e qual composto (celulose ou lignina) é degradado e a correta identificação da espécie de fungo.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, pode-se afirmar que:

- *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Exophiala* sp. e *Pestalotia* sp. foram os fungos com os maiores índices enzimáticos em relação à carboximetilcelulose. *Trichoderma* sp., *Phomopsis* sp., *Pestalotia* sp., *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. produziram os maiores diâmetros tanto da colônia quanto do halo, sendo, portanto, os que apresentaram maior atividade celulolítica. *Stachybotrys* sp. revelou ser o menos ativo na degradação da celulose. *Rhizopus* sp. não demonstrou atividade celulolítica.
- *Cladosporium* sp., *Stachybotrys* sp. e *Trichoderma* sp. foram os fungos com os maiores índices enzimáticos em relação ao ácido tânico. *Trichoderma* sp. e *Pestalotia* sp. produziram os maiores

diâmetros de halo e maior escurecimento do meio, com maior atividade lignolítica. *Stachybotrys* sp. demonstrou ser o menos ativo na degradação da lignina. *Rhizopus* sp. não demonstrou atividade lignolítica.

- Foi observada a especificidade de alguns fungos em relação ao substrato presente, pela maior atividade degradativa em carboximetilcelulose ou ácido tânico. A presença de alguns fungos com atividade enzimática muito baixa ou nula pode ser devida à utilização de outros compostos mais simples das acículas (açúcares livres, lipídios e proteínas), ao invés de celulose e lignina.

## REFERÊNCIAS

CASTRO, H. A.; KRÜGNER, T. L. Micro-organismos associados à podridão do cerne de árvores vivas de *Eucalyptus* spp. na região de Guaíba, RS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, p. 227 - 232, 1984.

DE OLIVEIRA, A. N.; ANDRADE, J. S.; DE OLIVEIRA, L. A.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 204 - 210, 2006.

DONNELLY, P. K.; ENTRY, J. A.; CRAWFORD, D. L.; CROMACK, K. Cellulose and lignin degradation in forest soils: response to moisture, temperature and acidity. **Microbial Ecology**, New York, v. 20, n. 3, p. 289 - 295, 1990.

GHIZELINI, A. M. **Sucessão de fungos em acículas de *Pinus taeda* em decomposição**. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

JENSEN, V. Decomposition of angiosperm tree leaf litter. In: DICKINSON, C. H.; PUGH, G. J. F. **Biology of plant litter decomposition**. London, 1974. v. 1, p. 69 - 104.

MILLAR, C. S. Decomposition of coniferous leaf litter. In: DICKINSON, C. H.; PUGH, G. J. F. (Eds.). **Biology of plant litter decomposition**. London 1974. v. 1, p. 105 - 128.

NOBLES, M. K. Identification of cultures of wood-inhabiting himenomycetes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 43, p. 1097 - 1139, 1965.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 7 - 9, 1996.

REISSMANN, C. B.; WISNIEWSKI, C. Aspectos nutricionais de plantios de *Pinus*. In: GONÇALVEZ, J. L. M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e Fertilização Florestal**. Piracicaba, 2000. v. 1, p. 135 - 165.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Editora Manole, 1991. v. 2. 126 p.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Jureia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205 - 211, 2004.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Lignina – método de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 917 - 928, 2001.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; MILANEZ A. I. Fungal succession on leaves of *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Muell. Arg. submerged in stream of a Atlantic Rainforest in state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 73 - 79, 1998.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71 - 78, 2002.

TAUKE, S. M. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 20, n. 1 - 4, p. 299-301, 1990.

TUITE, J. **Plant pathological methods – fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess Publishing Company. 1969. 239 p.

