

# XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

## “Atividade xilanolítica em fungos isolados de solo de manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga”

**GENILTON DA SILVA FAHEINA JUNIOR<sup>(1)</sup>, RAÍSSA MESQUITA BRAGA<sup>(2)</sup>, VERÔNICA REGINA DE OLIVEIRA LOPES<sup>(3)</sup>, CAROLINE GONDIM DE SOUZA<sup>(4)</sup>, MARIZA VIEIRA DA FONSECA SABOIA AMORIM<sup>(5)</sup>, SUZANA CLAUDIA SILVEIRA MARTINS<sup>(6)</sup>, GUSTAVO ADOLFO SAAVEDRA PINTO<sup>(7)</sup>, CLAUDIA MIRANDA MARTINS<sup>(8)</sup>**

**RESUMO** - Os mangues ocupam zona de transição entre dois biomas diferentes, onde a biodiversidade é maior e interagem fortemente com diferentes tipos de ecossistemas, onde o solo e a vegetação favorecem a adaptação de várias espécies, inclusive fungos, que por sua vez despertam cada vez mais interesses em relação à produção de enzimas xilanolíticas. O presente trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de produção de xilanases por fungos isolados do solo da Reserva Ecológica Sapiranga, em Fortaleza (CE). A coleta das amostras foi realizada no mês de março de 2009, sob condições chuvosas. O isolamento foi realizado através de plaqueamento de diluições em meio Martin (1950), com adaptações. Utilizou-se método de coloração com corante Vermelho Congo em meio contendo xilana oat-spelts (SIGMA) como única fonte de carbono para a avaliação da atividade enzimática. Além da atividade xilanolítica, obtida através do índice enzimático, foi medida a variação de crescimento das colônias. Dos 32 isolados fúngicos do manguezal de Sapiranga, todos apresentaram atividade xilanolítica, com índice enzimático (i.e.) variando de 1,0 a 8,83.

**Palavras-Chave:** bioma, enzimas hidrolíticas, matéria orgânica

### Introdução

Os manguezais são florestas úmidas, presentes nas faixas de transição entremarés características das zonas costeiras e confinadas em florestas tropicais e regiões subtropicais cuja composição baseia-se,

principalmente, na presença de plantas lenhosas. Uma vez que os mangues ocupam uma zona intermediária, considerados como um ecótono dinâmico (ou zona de transição entre dois biomas diferentes, onde a biodiversidade é maior) entre os habitats marinhos e terrestres, eles interagem fortemente com diferentes tipos de ecossistemas, onde a vegetação e o solo característicos favorecem a adaptação de várias espécies, inclusive fungos [1, 2].

Sob condições morfoclimáticas e físico-químicas específicas no ecossistema, os microrganismos que habitam os manguezais encontram uma variada quantidade de matéria orgânica presente nos variados tipos de solo, e destes aproveitam como uma fonte natural de energia [3]. A atividade da população micótica presente nesses ambientes depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina a ocorrência e distribuição desses microrganismos [4].

Os fungos presentes em manguezais representam o segundo maior grupo de fungos associados às condições marinhas [5]. Isolados fúngicos despertam cada vez mais interesse em estudos relacionados à biotecnologia, uma vez que são responsáveis, em conjunto com outros microrganismos, pela deterioração de vários materiais naturais e possuem um lugar de destaque como produtores de enzimas hidrolíticas, como as xilanases. Esses microrganismos desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de ciclagem de nutrientes, decompondo resíduos lignocelulósicos [6].

Diante do contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de produção de xilanases por fungos isolados do solo do manguezal de Sapiranga, em Fortaleza, Ceará.

<sup>(1)</sup> Primeiro autor é aluno do Curso de graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760. e-mail: genilton@gmail.com.

<sup>(2)</sup> Segundo Autor é aluna do Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

<sup>(3)</sup> Quarto Autor é Aluna do Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

<sup>(4)</sup> Quinto autor é Aluna do Curso de graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

<sup>(5)</sup> Terceiro autor é aluna do curso de Doutorado Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, CEP 60740-000.

<sup>(6)</sup> Sexto autor é Professora Adjunta IV do Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

<sup>(7)</sup> Sétimo autor é pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioprocessos. Rua Dr.<sup>a</sup> Sara Mesquita, 2270, Pici, Fortaleza, CE. CEP 60511-110.

<sup>(8)</sup> Oitavo Autor é Professora Adjunta II do Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

Apoio financeiro: CAPES e CNPq.

## Material e Métodos

### A. Coleta do solo

As amostras de solo foram obtidas do manguezal localizado na Reserva Ecológica Sapiranga, em Fortaleza (CE) durante o mês de março de 2009, sob condições chuvosas. As coletas foram realizadas em pontos definidos de acordo com a característica do sedimento presente no solo, assim como da vegetação.

O isolamento de fungos do solo do manguezal foi realizado através do plaqueamento de diluições das amostras de solo, em meio Martin segundo King et al. [7], com adaptações.

### B. Atividade xilanolítica

A atividade de xilanase foi realizada através do método de coloração com corante Vermelho Congo em meio contendo xilana oat-spelts (SIGMA) como única fonte de carbono [8]. A capacidade de degradação da xilana foi verificada no meio Ágar-xilana de acordo com a composição:  $\text{MgSO}_4$  ( $0,5\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{KCl}$  ( $0,5\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{NaNO}_3$  ( $3,0\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,01\text{g.L}^{-1}$ );  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $1,0\text{g.L}^{-1}$ ); ágar ( $15\text{g.L}^{-1}$ ); xilana oat spelts ( $2,0\text{g.L}^{-1}$ ), em pH 6,0. As placas contendo o meio xilana-ágar foram inoculadas com um repique pontual utilizando-se fungos cultivados em Ágar Batata Dextrose, conservados a  $30^\circ\text{C}$  durante 72 horas. Estas foram incubadas por 96 horas a  $28^\circ\text{C}$ .

A cada período de 24 horas, foram medidos os halos de crescimento do fungo tomando o devido cuidado de medir no mesmo horário da inoculação. Após o término do período de incubação, 96 horas, foi adicionado em cada placa 10 mL de solução corante Vermelho Congo ( $1\text{g.L}^{-1}$ ), permanecendo em repouso durante 15 minutos. A solução foi descartada lavando-se em seguida com solução de  $\text{NaCl}$  1M e repouso por um período de 15 minutos.

A atividade de xilanase foi observada através da presença de zonas claras, indicando halos de hidrólise, ao redor das culturas. O índice enzimático (i.e.) de cada microrganismo foi calculado dividindo-se os valores das medidas do halo de hidrólise com o diâmetro da colônia medido após quatro dias de crescimento.

## Resultados

Todos os fungos apresentaram crescimento em meio específico, após 96 horas de incubação. Das 32 cepas analisadas, apenas uma apresentou halo de hidrólise igual ao halo de crescimento, apresentando i.e. igual a 1,0 e 52% apresentaram i.e. maior que 2,0.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1, dois fungos isolados da amostra 06 destacaram-se estatisticamente dos demais, com valores de i.e. iguais a 3,96 e 8,83. No entanto, o perfil de crescimento da colônia diferiu em ambos os isolados. O crescimento do isolado 31, variou em média 5 cm durante os 4 dias. Enquanto o isolado 32 apresentou crescimento no meio de cultura somente após o 72 horas, com variação de apenas 1 cm.

## Discussão

Os valores de i.e. apresentados no presente estudo são mais elevados se comparados a estudos anteriores com análise da atividade xilanolítica em fungos de coleções de culturas, cujo maior i.e. apresentado foi 2,36 de *Aspergillus niger* [9]. Das 32 cepas, 46,9% apresentaram i.e. superior. Raghukumar et al. [10] relataram a presença de *Aspergillus niger* em um manguezal na Índia e avaliaram que fungo é o melhor produtor de xilanase termoestável livre de celulases, sob condições alcalinas.

O estudo baseia-se na análise enzimática de fungos isolados de seis pontos amostrais de solo do mangue. As amostras diferiram em relação à vegetação envolta, assim como na localização geográfica no manguezal, e presença de água, uma vez que o estudo foi realizado em período chuvoso. No momento da coleta, o solo da amostra 6 ( $3^\circ 47' 29''$ ) (Figura 2) era o único que não estava submerso em água. Deve-se salientar que a habilidade de um fungo em produzir enzimas varia entre espécies, como também entre isolados de uma mesma espécie e é bastante variável. O potencial de produção de enzima pode variar em função da distribuição geográfica do fungo, assim como característica das plantas e do solo, precipitação anual, etc. Em relação às condições ambientais, os fungos são organismos versáteis, havendo a possibilidade de alterações nas atividades metabólicas uma vez que há variações das condições físicas e químicas de um ambiente [11], [12].

Pouco se conhece a respeito dos fungos presentes nos manguezais, onde diferentes tipos de cepas fúngicas estão associados a esse ecossistema, em diferentes substratos, tais como folhas, caules, frutos e solo. Bennet [13] e Lima *et al.* [14] ressaltam que são os microrganismos que desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de ciclagem de nutrientes, decompondo resíduos lignocelulósicos, além de terem uma maior importância na biotransformação devido à alta capacidade celular e à versatilidade bioquímica. A produção de enzimas por fungos é considerada mais vantajosa devido à facilidade da extração.

Deve-se destacar que a variação dos resultados dos i.e. pode estar relacionada com a biodiversidade de fungos encontrados no solo do manguezal da Sapiranga, mesmo sob condições chuvosas na época da coleta. Segundo Atlas *et al.* [15], nos agroecossistemas as mudanças significativas e perceptíveis na comunidade microbiana estão relacionadas com as condições ambientais, sendo consequência principalmente do uso e das práticas de manejo do solo.

Serão realizadas novas coletas de solos do mesmo manguezal, porém sob distintas condições climáticas, afim de comparar os resultados da biodiversidade fúngica presente assim como a atividade enzimática.

## Conclusões

Dos 32 isolados fúngicos da Reserva Ecológica Sapiranga, todos apresentaram atividade xilanolítica, com i.e. variando de 1,0 a 8,83.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Prof. Dr. Oriel Herrera Bonilla, que foi de fundamental importância para a realização da coleta. Agradecemos também à Fundação Maria Nilva Alves, que permitiu o acesso da equipe a Reserva Ecológica Sapiranga.

## Referências

- [1] GOPAL, B.; CHAUHAN, M. 2006. Biodiversity and its conservation in the Sundarban mangrove ecosystem. *Aquat Sci*, 68:338–354.
- [2] MACINTOSH, D.J.; ASHTON, A.C. 2002 [Online]. *Review of Mangrove Biodiversity Conservation and Management*. homepage: [http://mit.biology.au.dk/cenTER/MCB\\_Files/2002\\_Review\\_B\\_MCB\\_Final.pdf](http://mit.biology.au.dk/cenTER/MCB_Files/2002_Review_B_MCB_Final.pdf).
- [3] SCHAEFFER-NOVELLI, Y. 1995. Manguezal ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo, *Caribbean Ecological Research*, 64p.
- [4] RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. 2004. Atividade da celulase de fungos filamentosos. *Revista Brasil. Bot.*, 27(2): 205-211.
- [5] LATHA, R.; MITRA, S. 2004. Mangrove Fungi in India. *Current Science*, 86(12).
- [6] BENNET, J.W. 1998. Mycothecology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 66: 101-107.
- [7] KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. 1979. Dichloranrosebengal Medium for the numeration and isolation of molds from foods. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 37: 959-964.
- [8] TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.
- [9] FAHEINA JUNIOR, G. S.; PINTO, G. A. S.; MARTINS, C. M. 2008. Avaliação do potencial biotecnológico de linhagens do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* para produção de enzimas hidrolíticas, com ênfase em celulases e xilanases. **In...** II Workshop Internacional Sobre Microbiologia Ambiental, 2008, Aracajú - SE.
- [10] RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V.R.; MISHRA, R; 2004. Xylanases of marine fungi of potential use of bioleaching of paper pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 31: 433–441.
- [11] CARROL, G.C. 1988. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69: 2-9.
- [12] LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. 2005. *Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Ed. Edgard Blucher. 535p.
- [13] BENNET, J.W. 1998. Mycothecology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 66: 101-107.
- [14] LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. Ed. Edgard Blucher, v. 3, São Paulo, 2005. 535p.
- [15] ADEMIR, C.S; SILVA, M.B; CAVALCANTI, M.A. 2002 [Online] *Fungos: o inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica*. Homepage: <http://www.geocities.com/biodiversidade2002/fungos.htm>

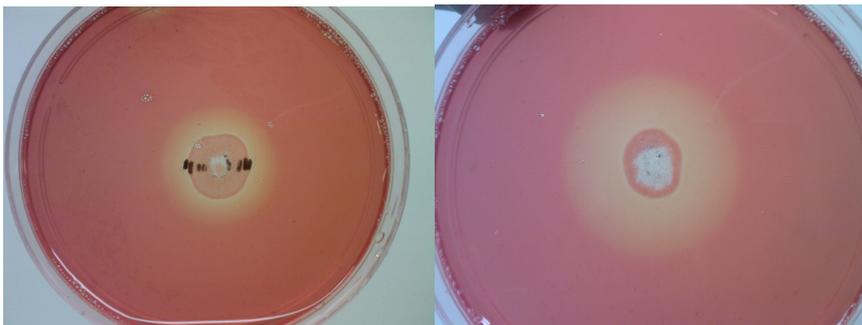
**Tabela 1.** Atividade da xilanase de cepas isoladas de solo de manguezal.

<b>Codificação</b>	<b>Ponto de coleta</b>	<b>Øc</b>	<b>Øh</b>	<b>i.e.*</b>
1	03	25,7	25,7	1,0 <sup>a</sup>
2	01	15,3	20,7	1,35 <sup>ab</sup>
3	05	31,3	46,7	1,49 <sup>abc</sup>
4	06	31,0	46,3	1,49 <sup>abc</sup>
5	06	37,7	56,3	1,49 <sup>abc</sup>
6	06	34,0	51,0	1,50 <sup>abc</sup>
7	03	30,0	48,3	1,61 <sup>abc</sup>
8	06	28,0	46,3	1,66 <sup>abc</sup>
9	05	10,3	17,3	1,68 <sup>abcd</sup>
10	06	32,3	54,7	1,69 <sup>abcd</sup>
11	03	29,3	49,7	1,69 <sup>abcd</sup>
12	03	25,3	43,0	1,70 <sup>abcd</sup>
13	06	26,3	48,0	1,82 <sup>abcd</sup>
14	03	12,7	25,0	1,99 <sup>bcde</sup>
15	02	15,0	30,0	2,00 <sup>bcde</sup>
16	04	12,3	25,3	2,04 <sup>bcdef</sup>
17	06	11,7	26,7	2,28 <sup>cdefg</sup>
18	06	12,7	31,7	2,50 <sup>defgh</sup>
19	05	12,3	34,0	2,74 <sup>efgh</sup>
20	01	16,3	45,0	2,75 <sup>efgh</sup>
21	03	16,3	45,7	2,87 <sup>efgh</sup>
22	03	14,0	42,3	3,03 <sup>ghi</sup>
23	03	18,0	55,0	3,06 <sup>ghi</sup>
24	02	17,0	52,0	3,06 <sup>ghi</sup>
25	05	14,7	47,0	3,22 <sup>hij</sup>
26	05	9,0	29,0	3,22 <sup>hij</sup>
27	04	13,7	44,7	3,27 <sup>hij</sup>
28	02	11,3	37,7	3,32 <sup>hij</sup>
29	01	12,0	40,0	3,33 <sup>hij</sup>
30	05	10,3	39,3	3,81 <sup>ij</sup>
31	06	11,0	43,3	3,96 <sup>j</sup>
32	06	2,0	17,7	8,83 <sup>l</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Øc = diâmetro da colônia (cm); Øh = diâmetro do halo (cm); i.e. = índice enzimático.



**Figura 1** – Amostra de solo do manguezal de Sapiranga



**Figura 2:** Placa de Petri com fungo após o teste para avaliação do índice enzimático, evidenciando o halo de hidrólise. ( $\varnothing_c$  = diâmetro da colônia;  $\varnothing_h$  = diâmetro do halo).