

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Identificação parcial de Fungos Celulolíticos Isolados de Solo da UEG Campus Palmeiras de Goiás

Priscila S. e Silva¹, Patrícia B. Jubé¹, João Marcos R. Ferreira¹, Gesllyny da S. Moura¹, Matheus N. dos Santos¹, Luiz Henrique B. Pires¹, Nayra R. Alcântara¹,
Fabrícia P. Faria², Saulo J. L. de Siqueira¹.

¹ Universidade Estadual de Goiás – Campus Palmeiras de Goiás
Rua S-7, s/ nº Setor Sul Palmeiras de Goiás-GO - E-mail: saulosiqueira@gmail.com

² Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas
Campus Samambaia, Goiânia-GO, CEP: 74001-970.

RESUMO

*O bioma Cerrado é conhecido por sua rica biodiversidade, também quanto à microbiota do solo. Entretanto, o Cerrado possui baixo registro de espécies de micro-organismos do solo, especialmente os fungos. Os fungos filamentosos são conhecidos produtores de enzimas para degradação de matéria orgânica do solo, principalmente a lignocelulose, sendo as celulases importantes em sua decomposição. O objetivo deste trabalho foi isolar fungos filamentosos de solo de área da Universidade Estadual de Goiás Campus Palmeiras de Goiás e realizar sua identificação por observação microscópica em microcultivo. Foram isolados fungos produtores de celulases de área cultivada (Soja e Sorgo) e sem cultivo. Isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificados e apresentaram índice enzimático de 1,4 e 1,2, respectivamente. Este estudo aponta a importância de aumentar o conhecimento sobre os fungos do Cerrado e seu potencial enzimático.*

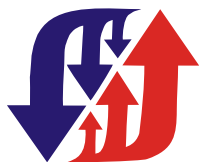
Palavras-chave: Fungos filamentosos, Cerrado, Microbiota solo, Enzimas hidrolíticas

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia, localizando-se em diversos estados brasileiros, sendo o principal bioma do estado de Goiás. Cerca de metade da área total do Cerrado já foi transformada em áreas de pastagens e de sistemas agrícolas. Essas alterações ameaçam as espécies nativas do cerrado, que tem uma biodiversidade considerada rica, sendo estimada em 160.000 espécies de plantas, fungos e animais (KLINK; MACHADO, 2005).

Os fungos filamentosos são organismos eucarióticos heterotróficos conhecidos por sua capacidade de degradar diversas substâncias devido à produção de enzimas que são secretadas sobre o substrato a ser utilizado como nutriente pelo organismo (PAPAGIANNI, 2004). O conhecimento da diversidade de fungos do solo de um ecossistema é importante quanto ao aspecto ecológico, para conhecimento de aspectos populacionais da microbiota do solo e também no auxílio de restauração de áreas degradadas (KUROKAWA, 2006; FREITAS *et al.*, 2009).

Existe um grande espectro de micro-organismos que degradam biomassa, principalmente celulose, produzindo diferentes complexos de enzimas que agem em conjunto. A celulose é uma das grandes fontes de carbono no solo e a ação das celulases é importante para a produção de energia desses micro-organismos que irão atuar na decomposição dessa



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

fração da matéria orgânica (FREITAS et al., 2009). O Cerrado é o Bioma brasileiro com um dos menores números de registros de espécies de fungos, sendo a Região Centro-Oeste a que possui menor número de registros sobre a biodiversidade dos fungos. Quanto aos fungos endêmicos, Goiás encontra-se em 19º lugar com apenas 104 espécies listadas (FORZZA *et al.*, 2010).

O solo da região do Campus Palmeiras de Goiás da Universidade Estadual de Goiás é uma área de pastagem que tem sido utilizada para experimentos dos cursos de graduação (plantio de culturas e plantas nativas) e representa uma parcela de solo que sofreu transformações as quais tem sofrido o bioma Cerrado. Sabendo-se do potencial da biodiversidade desse bioma, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos celulolíticos do solo da UEG Campus Palmeiras de Goiás e realizar a identificação morfológica por microscopia com a técnica de microcultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e isolamento de fungos - Foram coletados solos da área da UEG Campus Palmeiras de Goiás (Latitude: 16° 49' 25,42" S; Longitude: 49° 55' 22,25" W) em áreas de cultivo de Sorgo, Soja e área sem cultivo nos meses de Março e Abril de 2014. O isolamento dos fungos foi feito usando o método de análise indireta por cultivo utilizando diluição seriada de solução de solo. A coleta de solo, processamento das amostras e o cultivo dos fungos foi feito conforme Monteiro (2012), com modificações. Cada colônia isolada com aspecto morfológico distinto em placa foi considerado um morfotipo.

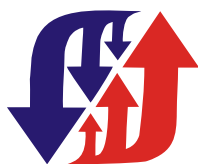
Deteção da atividade de celulase pelos fungos isolados – a seleção dos isolados produtores de celulases foi realizada através do método de coloração com Vermelho Congo em meio contendo Carboximetilcelulose (0,5%) (THEATER; WOOD, 1982). A atividade das celulases foi observada pela presença de zonas claras, indicando halos de hidrólise, ao redor das culturas. O índice enzimático (I.E.) de cada micro-organismo foi calculado dividindo-se os valores das medidas do raio do halo de hidrólise pelo o raio da colônia medido após o período de crescimento. As linhagens que mostrarem $IE \geq 1,0$ foram consideradas produtoras de celulases.

Microcultivo em lâmina e identificação dos isolados - a técnica de microcultivo foi feita conforme Levy (2004). As lâminas foram observadas em microscópio e as imagens obtidas com o uso de câmera fotográfica. Para a identificação das espécies, foram utilizadas literaturas contendo chaves e fotos para identificação (WATANABE, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir do solo do Campus da UEG Palmeiras de Goiás, foram isolados ao total 44 colônias, sendo 30 da área de plantio de Soja (isolados SJU), 6 da área de plantio de Sorgo (isolados SRU) e 8 da área sem cultivo (isolados SCU). Desse total, foram detectados 20 morfotipos, sendo 10 SJU, 5 SRU e 5 SCU. Apenas um morfotipo em comum foi determinado entre as áreas de Soja e Sorgo (SJU 02 e SRU 05). No estudo de Coêlho *et al.* (2008), a comparação no número de fungos isolados a partir de área nativa e a partir de área de plantio de cana-de-açúcar não apresentou diferença significativa.

Dos 20 morfotipos de fungos analisados para a produção de celulases, 14 apresentaram halo de hidrólise em meio contendo CMC corado com Vermelho Congo, sendo



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

7 isolados SJU, 4 isolados SRU e 3 isolados SCU. Para cada um dos morfotipos produtores de celulase foi determinado o Índice Enzimático (Tabela 01).

Tabela 01 – Dados da produção de celulases pelos fungos isolados a partir de solo das diferentes áreas analisadas. Foram avaliados o raio de crescimento do micélio (rM), o raio do halo de atividade enzimática (rAE) e o Índice Enzimático

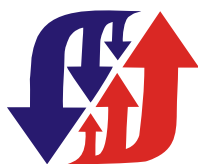
Área Analisada	Código do Isolado	Raio do Micélio* (rM-cm)	Raio de Atividade* rAE (cm)	I.E. (rAE/rM)
UEG-Palmeiras Soja	SJU 01	1,5	2,1	1,4
	SJU 1.1	3,4	4,1	1,2
	SJU 02	2,7	3,5	1,3
	SJU 2.1	3,3	4,0	1,7
	SJU 03	3,0	3,5	1,2
	SJU 04	2,6	3,2	1,2
	SJU 5.1	2,6	3,7	1,4
UEG-Palmeiras Sorgo	SRU 03	1,7	2,4	1,4
	SRU 04	3,0	3,5	1,2
	SRU 05	2,8	3,6	1,3
	SRU 06	2,6	3,8	1,5
UEG-Palmeiras Sem Cultivo	SCU 01	2,7	2,8	1,0
	SCU 12	2,5	3,0	1,2
	SCU 08	2,8	3,7	1,3

* Os dados representam a média de pelo menos dois ensaios realizados para cada morfotipo.

A partir da técnica de microcultivo foram parcialmente identificados os isolados SCU 12 (*Penicillium* sp.), SJU 5.1 (*Aspergillus* sp.) e SRU 05 (*Verticillium* sp.). Dois isolados que não apresentaram halo de degradação de CMC em placa foram parcialmente identificados como *Sordaria* sp. (SCU 02) e *Fusarium* sp. (SRU 2.2). Na Figura 01 estão apresentadas as micrografias obtidas a partir do microcultivos dos isolados parcialmente identificados. Os isolados SJU 2.1 e SRU 03 apresentaram como bons produtores de celulases pelo índice enzimático (1,7 e 1,4, respectivamente) além do isolado SJU5.1 *Aspergillus* sp. (I.E. 1,4). Florencio (2011) isolou fungos do gênero *Trichoderma* produtores de celulases com índice enzimático mais frequentes próximo a 1,4. Fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* estão entre as espécies mais comumente encontradas no solo de diversos habitats e são bastante estudados como produtores de celulases (Monteiro, 2012; Florencio, 2011).

CONCLUSÕES

Dentre os fungos isolados do solo do Campus foram encontrados gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que estão entre os mais estudados para produção de celulases. Os índices enzimáticos dos isolados indicam que são bons produtores de celulases e, considerando a grande biodiversidade do bioma Cerrado, estudos para se conhecer as espécies de fungos desse bioma são importantes para conhecer o potencial enzimático, especialmente de celulases, das linhagens presentes nesse meio.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

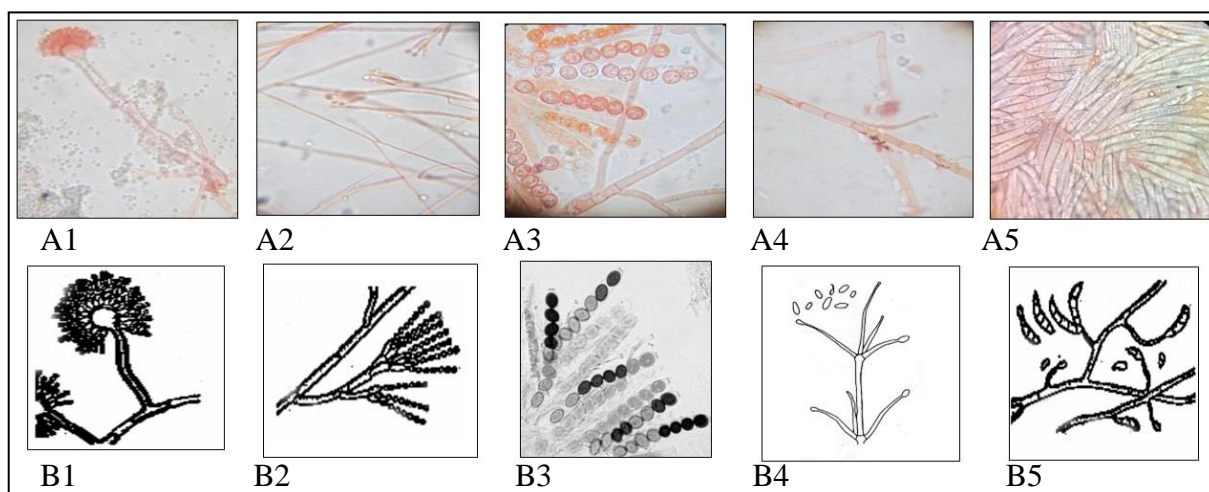


Figura 01 – Morfologia de características microscópicas dos isolados analisados. A - Micrografia dos isolados analisados crescidos por microcultivo em lâmina (A1 – SCU12; A2 – SJU5.1; A3 – SCU02; A4 – SRU05; A5 – SRU2.2. Fonte: este trabalho). B – desenhos de fungos representando os gêneros identificados (B1 – *Aspergillus* sp.; B2 – *Penicillium* sp., B3 – *Sordaria* sp.; B4 – *Verticillium* sp.; B5 – *Fusarium* sp. Fonte WATANABE, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COELHO, D.G.; SANTOS, T.M.C.; ALBUQUERQUE, L.S; CAMPOS, V.B.; PRAZERES, S.S. Quantificação de fungos celulolíticos em solos de três ecossistemas. *Revista Verde*, Mossoró, v.1, n.3, p.45-49 de jul./set. 2008.
- FREITAS, V.L.O, MELLO, F.S.S.; GARCIA, K.V.C.N.; JALES, L.F. Isolamento de fungos solubilizadores de fosfato e celulolíticos de uma pilha de rejeito - em processo de restauração - e no cerrado, no município de Papagaio, MG. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, São Lourenço – MG, set. 2009.
- FLORENCIO, C. *Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de Trichoderma spp.* Dissertação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.
- FORZZA, R.C., *et al.* *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Vol1, 2010.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, v.1, n.1, 2005.
- KUROKAWA, A.S. Exploração biotecnológica de microrganismos de solo de Cerrado através da construção de bibliotecas metagenômicas e técnicas de cultivo. Dissertação, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2006.
- LEVY, C. E. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. ANVISA. Módulo VII. 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em 23 de abril de 2015.
- MONTEIRO, M.C.P. Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado. Dissertação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 22, p. 189-259, 2004.
- WATANABE, T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2010.
- TEATHER, R.M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* v.43, p.777-780, 1982.