



PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS E LIGNINOLÍTICOS PARA MANEJO EM CAMPO DA PALHADA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Gabriela De Cia **Moraes**¹; João Luiz da **Silva**²; Henrique Barros **Vieira**²; Raissa Sylvestrin
Stancatte³; Nilza Patrícia **Ramos**⁴

Nº 15417

RESUMO – O trabalho teve como objetivo selecionar isolados de micro-organismos com ação celulolítica e ligninolítica capazes de acelerar o processo natural de decomposição da palhada de cana-de-açúcar, em campo. Para isto foram coletadas amostras de solo logo abaixo da palha, em três localidades (Araras-SP, Iracemópolis-SP e Guaíra-SP), onde se conduzem experimentos com variações nos níveis (25-50-75-100%) deste resíduo. Foram isolados fungos, bactérias e actinobactérias de cada local e nível de palha, procurando-se isolados com atividade celulolítica e ligninolítica. A verificação da ação decompositora de lignina ou celulose foi realizada incubando-se estes organismos em meios específicos para estes compostos e observando-se a formação ou não de halos. Obtiveram-se 72 isolados de fungos com ações decompositoras, dos quais 39 apresentaram ação celulolítica, sendo 18 provenientes de Araras, 13 de Iracemópolis e 08 de Guaíra. Também houve diferença no número de micro-organismos decompositores entre os níveis de palhada, com 51% dos isolados no tratamento 25% de palhada, seguido de 31% do nível 50% e apenas 12 e 5%, respectivamente para 75 e 100%. Com relação aos isolados de fungos com ação ligninolítica (36), estes também foram selecionados em maior quantidade nos menores níveis de palhada. Conclui-se: o número de micro-organismos decompositores de palhada de cana-de-açúcar varia entre localidades e entre os níveis de palhada mantidos sobre o solo após a colheita. Há predominância de fungos em relação às bactérias e actinobactérias. Dois isolados de fungos apresentaram ação tanto celulolítica como ligninolítica, ideais para a decomposição da palhada.

Palavras-chaves: cana-de-açúcar, celulose, lignina, palha, decomposição.

¹ex-Bolsista PIBIC, graduanda Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP; gabrieladcmoraes@gmail.com;

²Eng. Agrônomos, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP;

⁴Bolsista Embrapa, graduanda Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP; ra.sstancatte@gmail.com;

⁵Orientadora - Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP – nilza.ramos@embrapa.br.



ABSTRACT - *The project aimed to select microorganisms with cellulolytic and ligninolytic action able to accelerate the natural process of decomposition of the straw from sugar cane in the field. Soil samples were collected at three locations (Araras, SP, SP-Iracemópolis and Guaira-SP), with variations in the level of straw (25-50-75-100%) maintained on the soil surface after harvest, The samples were taken in the pre-harvest period. They were followed for isolation, multiplication and determination of cellulolytic and ligninolytic activity. Evaluation of the activity was determined by presence or not of halos on the specific media – from the 72 fungi recovered, 39 showed cellulolytic action (18 from Araras, 13 Iracemópolis and 08 Guaira). There was a difference among the cellulolytic fungi depending on the levels of sugar cane straw: 51% were originated from the 25% straw treatment, followed by 31% of the level 50% straw and only 12 and 5%, for the 75 and 100% levels respectively. Similar results were observed for ligninolytic microorganisms (36), with just 5% of the isolates obtained from the highest straw level (100%). It is relevant to emphasize that there are two fungi isolated, with simultaneous cellulolytic and ligninolytic action. It is possible to conclude that the selection of microorganisms able to decompose sugar cane straw depends on local of production and level of straw maintained at soil surface. Fungi isolated are predominant to bacteria and actinobacteria. Two fungi isolated have cellulolytic and ligninolytic action what is considered ideal for straw field decomposition.*

Key-words: sugar cane, cellulose, lignin, straw, decomposition.

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento dos resíduos agropecuários como fertilizante já é uma prática consolidada que, dependendo da matéria prima, necessita passar pelo processo de compostagem antes de sua aplicação em campo (FERREIRA JR. et al., 2011). Neste processo, micro-organismos decompositores quebram as estruturas celulares da matéria orgânica (lignina, celulose e hemicelulose) e liberam nutrientes que serão aproveitados pelas plantas em sua nutrição (COTRUFO et al., 2009). No caso de resíduos essencialmente agrícolas há ainda a possibilidade desta decomposição ocorrer direto em campo, porém em tempo prolongado.

A colheita mecanizada da cana-de-açúcar abriu caminho para a manutenção da palhada sobre o solo em quantidades da ordem de 10 a 30 t ha⁻¹ (VITTI et al., 2007) que, se decomposta, contribui sensivelmente para a redução na fertilização da cultura. Entretanto, a literatura tem mostrado que o processo de decomposição da palhada da cana-de-açúcar é lento devido à



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

elevada relação C:N deste resíduo (COTRUFO et al., 2009), chegando à 60% ao final de uma safra (FORTES, 2010; YAMAGUCHI et al., 2013; MORAES et al., 2014).

Acelerar a decomposição da palhada traria benefícios para o atual sistema produtivo da cana-de-açúcar, pois disponibilizaria nutrientes em períodos de aproveitamento da cultura numa mesma safra. Para isto, a ação dos micro-organismos decompositores precisa ser potencializada, o que implica em melhor quebra tanto da celulose, que constitui cerca de metade a um terço dos tecidos das plantas, como da lignina um polímero que confere a rigidez das células e tecidos e de difícil decomposição (RAES et al., 2003; CABANÉ et al., 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo selecionar isolados de micro-organismos com ação celulolítica e ligninolítica capazes de acelerar o processo natural de decomposição da palhada de cana-de-açúcar, em campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A prospecção de isolados de micro-organismos com ação decompositora ocorreu na safra de 2012/2013 em amostras de solo de cana-de-açúcar, provenientes de áreas experimentais (Guaíra, Itacemópolis e Araras/SP) no período pré-colheita das variedades RB-845210, RB 86-7515 e CTC14; com amostragem em todos os blocos e tratamentos experimentais com níveis de palhada (25 – 50 – 75 – 100%) mantidos sobre o solo.

Após as coletas as amostras seguiram para Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA), sendo mantidas em ambiente controlado (5°C) até o isolamento e multiplicação dos isolados. O isolamento ocorreu pela técnica de diluições seriadas, onde 10g de amostra de solo com palha de cana foram homogeneizadas em 90 mL de água salina 0,85% e colocadas para agitação por um período de 20 minutos (diluição 10^{-1}). A segunda diluição (10^{-2}) foi realizada transferindo-se 1 mL da diluição 10^{-1} para tubo de ensaio contendo 9mL de água salina 0,85%, e assim sucessivamente até a diluição 10^{-7} . As diluições foram plaqueadas (Petri Ø 90 mm) em meio de Martim (Agar: 16 g.L⁻¹; peptona: 5 g.L⁻¹; dextrose: 10 g.L⁻¹; K₂PO₄ : 1 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O: 0,5 g.L⁻¹; Rosa bengala: 0,03 g.L⁻¹) para isolamento de fungos. De cada diluição foi retirada uma alíquota de 100µL e realizada a inoculação na superfície do meio solidificado, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em B.O.D. a 28 ± 1°C, durante 5 dias. A sequência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias. Feito isto, determinou-se o número de isolados obtidos em cada nível de palhada e local de coleta.

Os isolados dos fungos foram preservados pelo método Castellani e as bactérias e actinobactérias em solução com 20% de glicerol e mantido em refrigeração a 80°C. Tendo em vista

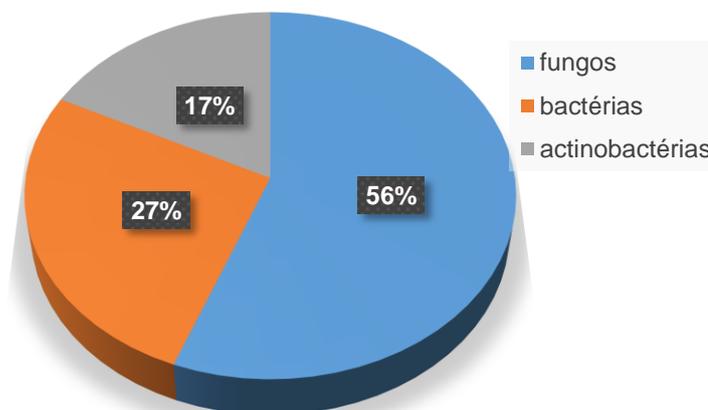


o grande volume de isolados de fungos, optou-se pelo teste de ação celulolítica e ligninolítica apenas destes micro-organismos; o qual foi feito por atividade enzimática seguindo metodologia adaptada de Nogueira & Cavalcanti (1996) para celulose, nos quais os isolados de fungos foram cultivados em meio sintético CMC (NaNO_3 : $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; K_2HPO_4 : $1,0 \text{ g.L}^{-1}$; MgSO_4 : $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $0,01 \text{ g.L}^{-1}$; CMC: $10,0 \text{ g.L}^{-1}$; ágar: $15,0 \text{ g.L}^{-1}$; extrato de leveduras: $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, Triton X-100 1% após resfriamento), com incubação de 7 dias em BOD a $28^\circ \pm 1^\circ \text{ C}$. Feito isto, adicionou-se 5 mL de solução corante de vermelho congo ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) e após 30 minutos lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M.

Para as atividades enzimáticas de cunho ligninolítico transferiu-se os isolados para placas de lignina pelo método adaptado de Silva (2005), (15 g/L de Agar, 24 g/L de extrato de levedura). Para verificação da degradação do Remazol Brilhante Blue (RBBR) o meio de cultura foi acrescido de 0,05% do corante, pH 4,6 e mantido sob crescimento em BOD durante 7 dias à $28^\circ \pm 1^\circ \text{ C}$. As atividades enzimáticas foram evidenciadas pelo surgimento de halo ao redor do ponto de aplicação, sendo considerado como eficiente o isolado que formou o halo, sem medição de diâmetro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas realizadas em área experimental com variações no manejo da palhada permitiram selecionar um total de 188 micro-organismos, sendo 105 isolados de fungos (56%), 50 de bactérias e 33 de actinobactérias (Figura 1). Esta quantificação inicial não levou em consideração a ação decompositora dos micro-organismos, porém a predominância de fungos foi considerada como bom indicador de sucesso na prospecção, tendo em vista os relatos na literatura de ação intensa destes indivíduos no processo de decomposição de material vegetal (BELL et al., 2005).





9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Figura 1. Distribuição percentual de micro-organismos isolados a partir de amostras coletadas em áreas de manejo de palhada de cana-de-açúcar, em diferentes locais de São Paulo, na safra 2012-2013.

A Tabela 1 apresenta os resultados de fungos com potencial de decomposição de celulose em função dos níveis de palhada e área de coleta. Observou-se a formação de halos em meio celulolítico para 39 destes isolados e 36 halos em meio ligninolítico (Tabela 2), o que corresponde a 37% com ação celulolítica e 34% com ação ligninolítica.

Na Tabela 1 observa-se que Araras-SP foi a região com maior contribuição de fungos (46%) seguida de Iracemápolis (33%) e Guáira (21%). O número de isolados a partir dos níveis de palhada de cana-de-açúcar também variou, com 51% destes indivíduos originados a partir do tratamento 25% de palhada, seguido de 31% do nível 50% de palhada e apenas 12 e 5%, respectivamente para os níveis 75 e 100%.

Tabela 1. Demonstrativo da quantidade de isolados de fungos com potencial de decomposição de celulose (halos), prospectados a partir de áreas experimentais com cana-de-açúcar (Araras, Iracemápolis, Guaira/SP), envolvendo níveis de palhada, na safra 2012-2013.

Tratamento (%)	Quantidade de fungos celulolíticos (número)			Total
	Araras-SP	Iracemápolis-SP	Guáira-SP	
25	8	8	4	20
50	5	4	3	12
75	4	1	0	5
100	1	0	1	2
Total	18	13	8	39

Na Tabela 2 confirmou-se maior presença de isolados de fungos decompositores na área de Araras-SP em relação às demais. Isto porque houve maior quantidade (16) de fungos com potencial de decomposição de lignina também nesta área. A segunda área mais expressiva para lignina foi Guáira, não corroborando com o observado para os isolados de fungos celulolíticos.

Tabela 2. Demonstrativo da quantidade de isolados de fungos com potencial de decomposição de lignina (halos), prospectados em áreas experimentais com cana-de-açúcar (Araras, Iracemápolis, Guaira/SP), envolvendo níveis de palhada, na safra 2012-2013.

Tratamento (%)	Quantidade de microorganismos ligninolíticos (número)			Total
	Araras-SP	Iracemápolis-SP	Guáira-SP	
25	1	3	6	10
50	5	2	5	12
75	8	3	1	12



100	2	0	0	2
Total	16	8	12	36

Para os níveis de palhada com isolados ligninolíticos nota-se que, diferente dos celulolíticos, os valores demonstram que os níveis 25, 50 e 75% não obtiveram diferença para o total de micro-organismos por tratamento. Para os três tratamentos obteve-se 30% de fungos com capacidade celulolítica e somente 5% é proveniente do tratamento 100%, esse nível de palha corrobora com as informações da Tabela 1, que cita o tratamento com maior nível de palhada como o que possui menor quantidade de micro-organismos degradadores.

A maior quantidade de isolados de fungos nos tratamentos com menor nível de palhada (25 e 50%) não era esperada, pois se acreditava que a escassez de biomassa pudesse selecionar apenas micro-organismos decompositores mais agressivos. Vargas e Scholles (2000) afirmam que a presença de resíduos sobre o solo promove aumento da atividade dos micro-organismos heterotróficos do solo, que, aliado a condições favoráveis como maior umidade e temperatura contribuem para o aumento na atividade microbiana. Porém os dados tanto de celulolítico como ligninolíticos indicaram o contrário, pois em todas as áreas estudadas o número de decompositores foi inferior para o tratamento com 100% de palhada.

Após a quantificação dos isolados de fungo, em função da ação decompositora de celulose e lignina, verificou-se que dois isolados apresentaram ação simultânea para lignina e celulose. Um isolado foi obtido de amostra de Araras-SP e outro de Guaira-SP. O que mais chamou a atenção foi o fato de ambos terem sido prospectados no tratamento contendo de 50% de palhada (Figura 2). Caso esta ação se confirme em testes futuros estes isolados terão amplo potencial de uso como ativo biológico a ser aplicado na palhada de cana-de-açúcar, com o intuito de acelerar o processo de decomposição deste resíduo.

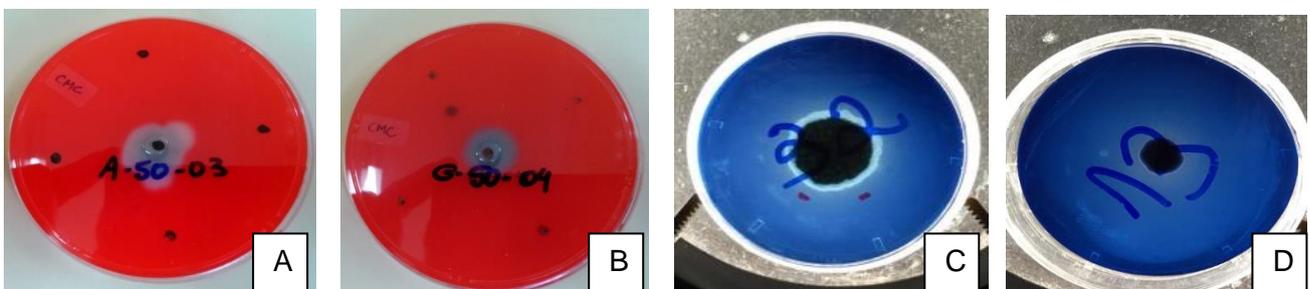


Figura 2. Halos de isolados de fungos decompositores, com ação sobre a celulose, selecionados em área contendo 50% de palhada de cana-de-açúcar em Araras (A), Guaira (B), e com ação sobre lignina (Araras (C) e Guaira (D)).



4 CONCLUSÃO

O número de micro-organismos decompositores de palhada de cana-de-açúcar varia entre localidades e entre os níveis de palhada mantidos sobre o solo após a colheita.

Há predominância de fungos em relação às bactérias e actinobactérias.

Dois isolados de fungos apresentaram ação tanto celulolítica como ligninolítica, ideais para a decomposição da palhada.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq-PIBIC, pela bolsa concedida e a Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELL, M. J., Stirling, G. R. and Pankhurst, C. E. (2005). Management impacts of health of soils supporting Australian grain and sugarcane industries. *Soil Till. Res.* (in press).

CABANÉ, M.; PIREAUX, J.C.; LEGER, E.; WEBER, E.; DIZENGREMEL, P.; POLLET, B.; LAPIERRE, C. Condensed lignins are synthesized in polar leaves exposed to ozone. **Plant Physiology**. V.134, p.586-594. 2004

COTRUFO, F. C.; GALDO, I. D.; PIERMATTEO, D. Litter decomposition: concepts, methods and future perspectives. In: KUTSCH, W. L.; BAHN, M.; HEINEMEYER, A. (Ed.). **Soil carbon dynamics**: an integrated methodology. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p. 76-90

FERREIRA JR, Osvaldo L. et al. Atividade de enzimas lignocelulíticas envolvidas na degradação do bagaço de cana-de-açúcar por linhagens fúngicas da Caatinga. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2011, Campinas. **Anais...** . Campinas: 5, 2011.

FORTES, C. **Produtividade de cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada e da decomposição da palhada em ciclos consecutivos**. 2010, 153 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) CENA-USP, Piracicaba, 2010..

MORAES, G. D. C.; N. P.; PIRES, A. M. M.; VIEIRA, H. B.; HIRANO, R. T.; ROSETTO, R. Impacto do manejo da palhada sobre sua decomposição em área cultivada com cana-de-açúcar no município de Guaíra – SP. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 34., 2014, Campinas . **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2014. 4 p

NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia** 27:7-9.

RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J.H.; Van de PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**. V.133, p.1051-1071. 2003



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

SILVA, C.M.M.S.; et al. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 324-329, 2005

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 750 p.

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um solo Podzólico vermelho-escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v.24, n.1., p.35-42, 2000.

VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O.; GAVA, G.J.C; PENATTI, C.P.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; FRANCO, H.C.J. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual e do sistema radicular **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 249-256, 2007

YAMAGUCHI, C. S.; ROSSI, P.; RAMOS, N. P.; PIRES, A. M. M.; ROSETTO, R. Mineralização de C e de N na palhada de cana-de-açúcar. In: Congresso Brasileiro De Ciência Do Solo, 34., 2013, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013. 4 p