

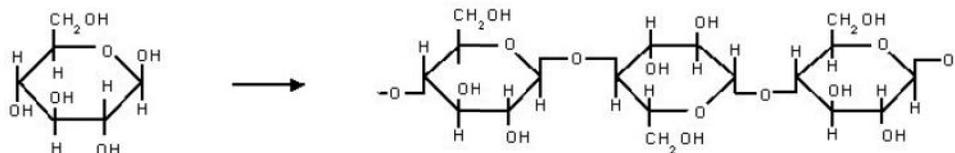
CAPÍTULO VIII

MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

A celulose é o mais abundante composto orgânico presente na natureza, representando de 15 a 60 % da matéria seca dos vegetais incorporados ao solo. Encontra-se em plantas, sementes, algas, fungos e cistos de protozoários, sendo o principal componente dos vegetais, constituindo, por exemplo, quase 100 % do algodão (CARVALHO et al., 2009).

Celulose é um carboidrato composto de unidades de anidroglicose unidas pelas ligações β 1-4 nos átomos de carbono, com número variável entre 2.000 e 10.000 unidades por molécula e, em alguns casos, atingindo até 15.000 unidades, em longa cadeia linear não ramificada (CERRI et al., 1993). Possui fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, com um valor mínimo de $n = 200$. A estrutura da molécula de celulose pode ser visualizada na Figura 3:



Fonte: Polymar (2013).

Figura 3. Estrutura química da molécula de celulose.

A celulose tem uma estrutura linear ou fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias justapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais (CERRI et al., 1993). É um dos principais constituintes da parede celular das plantas (cerca de 33,0 % da massa da planta). Em combinações com a lignina, a hemicelulose e a pectina não são digeridas pelo homem, constituindo uma fibra dietética (SEABRIGHT, 1995), porém, animais ruminantes, como bovinos, girafas e camelos, podem digerir a celulose com uma bactéria celulolítica do gênero *Celulomonas*.

O conteúdo de celulose das plantas superiores nunca é fixo e a concentração varia com a idade e a espécie da planta. É especialmente abundante em materiais lenhosos, na palha, restolho e folhas.

Grande parte das populações microbianas heterotróficas do solo é representada por bactérias, fungos e actinobactérias, e caracteriza-se pela habilidade de decompor celulose, utilizando-a como fonte de carbono e energia. Esses micro-organismos constituem um grupo funcional denominado micro-organismos celulolíticos.

A degradação da celulose no solo se dá pelo complexo enzimático denominado celulase, produzido por bactérias aeróbias e anaeróbias, actinobactérias e fungos, sendo estes os principais agentes de degradação (CATELLAN; VIDOR, 1990a). A celulase é uma mistura de enzimas envolvidas na degradação da celulose. Os três maiores grupos de celulase que participam da hidrólise são: endoglucanase, hexoglucanase ou cellobiohidrolase e betaglucosidase (SUN; CHANG, 2002).

Em ambiente aeróbio, os micro-organismos oxidam a glicose via ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CTA) e a decomposição resulta na produção de CO₂ e substância celular, com a participação de todos, principalmente dos fungos, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecolomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002). As principais bactérias aeróbias produtoras de celulase, que desdobram a celulose, são *Cellulomonas*, *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*. Entre as actinobactérias, destacam-se as termofílicas *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces* e a mesofílica *Streptomyces* (SINGH; HAYASHI, 1995).

As actinobactérias são estimuladas somente no final da decomposição dos resíduos orgânicos, por apresentarem desenvolvimento mais lento (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Silva Filho e Vidor (1984) constataram que a maior população de micro-organismos celulolíticos, no Rio Grande do Sul, ocorreu em solos com pastagem cultivada (10³ UFC g⁻¹ de solo), superior ao solo submetido a diferentes sistemas de manejo convencional, plantio direto, rotação de culturas e campo nativo.

Dionísio (1996), trabalhando em áreas de cultivo de *Eucalyptus grandis* com calagem, adubação mineral e orgânica, e combinações das formas de adubação, constatou que as densidades de micro-organismos celulolíticos na camada do solo de 0,0 a 5,0 cm foram superiores nos tratamentos que receberam adubação orgânica.

PROTOCOLO VI

CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio de 15 mL com rosca, placas de Petri e alça de Drigalsky;
- Equipamentos: agitador mecânico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina e agitador de tubos;
- Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e meio de cultura celulose-ágar (Tabela 9);
- Outros: funil plástico (\varnothing 10,0 cm), micropipetas com ponteiras de 0,1 mL, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável), parafilm, pera insufladora e gás butano; e,
- Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

Tabela 9. Meio de cultura celulose-ágar.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Celulose*	12,0
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

Fonte: Parkinson et al. (1971).

* Carboximetil celulose.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, obtido conforme o Capítulo II (p. 14), previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de micro-organismos celulolíticos e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico (\cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);
- e) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- g) Após cada transferência, descartar as ponteiras utilizadas em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1);
- h) Pipetar, com ponteiras diferentes, 0,1 mL das etapas “d”, “e” e “f” e transferir para placas de Petri contendo o meio de cultura celulose-água;
- i) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;
- j) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante 7 dias;
- k) Após 7 dias, considerar somente as colônias que formarem, ao seu redor, um halo transparente, que corresponde à celulose degradada;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).