

XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

“Atividade celulolítica de fungos isolados do solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga”

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

RESUMO A hipótese do trabalho é baseada na provável atividade celulolítica de fungos isolados do solo de mangue. O presente estudo analisou a atividade da celulase de fungos isolados de solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga. Foram analisadas 45 cepas quanto ao potencial de produção de celulases em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono, em meio de cultura. Foi utilizada a técnica de coloração com vermelho congo para determinar a atividade da celulase. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois algumas cepas se destacaram das demais quanto ao seu potencial de degradação da celulose. Os resultados obtidos são preliminares e fornecerão subsídios para prosseguir a pesquisa sobre o potencial de produção de celulase dos fungos isolados do mangue.

Palavras-Chave: celulase; enzima hidrolítica; potencial enzimático

Introdução

A intensa pesquisa sobre celulases teve início na década de 1950, devido ao seu enorme potencial em converter lignocelulose em glicose e outros compostos solúveis [1].

As celulases são produzidas principalmente a partir de microrganismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade de controle operacional e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais. As vantagens do uso de enzimas em vários processos estão relacionadas ao alto grau de especificidade das reações,

o que contribui com a eficiência do processo, e ao fato de serem produtos naturais biológicos podendo ter sua atividade regulada e ainda atuarem em concentrações baixas sob condições brandas de pH e temperatura [2].

Nas áreas de manguezais, os fungos podem estar presentes em árvores vivas ou na vegetação morta, como saprófitos, parasitas ou simbioses. As espécies parasitas causam doenças nas árvores, porém, a maioria dos fungos são saprófitos na serrapilheira e madeira em decomposição, agindo como decompositores na cadeia alimentar destes ecossistemas [3]. Os fungos pertencentes à divisão Basidiomycota correspondem ao principal grupo responsável pela degradação da madeira, sendo a maioria capaz de degradar hemicelulose, celulose e lignina [4].

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose [5].

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina sobremaneira a ocorrência e a distribuição desses organismos. O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos tornando-se

⁽¹⁾ Primeiro Autor é Aluna do Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760. e-mail: carolinegondimdesouza@hotmail.com

⁽²⁾ Segundo autor é Aluna do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

⁽³⁾ Terceiro autor é aluna do curso de Doutorado Rede Nordeste em Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, CEP 60740-000.

⁽⁴⁾ Quarto autor é Aluno do Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

⁽⁵⁾ Quinto autor é Aluna do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Campus do PICI, Fortaleza, CE, CEP 60455-760.

⁽⁶⁾ 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.

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

⁽⁸⁾ 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.

importantes para as interações ambientais. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural [6].

O presente trabalho teve como objetivo avaliar fungos isolados de solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiroanga, quanto à produção de celulases, em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono.

Material e Métodos

A. Microrganismos

Os fungos foram isolados de solo de manguezal da Reserva Ecológica de Sapiroanga (Fortaleza-CE).

B. Atividade Enzimática

Foram realizados testes para a verificação da capacidade de degradação de celulose em 45 cepas. A análise da atividade enzimática foi fundamentada na metodologia descrita por Teather & Wood [7]. A capacidade de degradação de celulose foi verificada através do meio de cultura Ágar Celulose, que possui a seguinte composição química: MgSO_4 ($0,5\text{g.L}^{-1}$); KCl ($0,5\text{g.L}^{-1}$); NaNO_3 ($3,0\text{g.L}^{-1}$); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01\text{g.L}^{-1}$); K_2HPO_4 ($1,0\text{g.L}^{-1}$); Ágar-ágar (15g.L^{-1}); Celulose micro cristalina ($5,0\text{g.L}^{-1}$). Os microrganismos foram inoculados com uma alça no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura específico. As placas em triplicata foram incubadas por 4 dias a 30°C . Depois desse período, foi vertido sobre as placas 10 mL de solução corante de vermelho congo (1g.L^{-1}), após 15 minutos em repouso a solução foi descartada. Em seguida as culturas foram lavadas com solução de NaCl 2M e deixadas em repouso com esta solução por um período de 15 minutos. A presença de zonas claras ao redor das culturas indica a atividade de celulase, além da magnitude desta (Figura 1). Os diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise produzidos foram medidos com régua milimetrada durante os quatro dias, no mesmo horário. O índice enzimático foi calculado dividindo-se os valores desses halos, tendo o halo de crescimento do fungo como denominador.

C. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade usando o programa estatístico Sisvar.

Resultados

A formação do halo indicador da atividade de celulase foi observada em 35 cepas, ou seja, cerca de 80% das cepas analisadas (Tabela 1).

Dentre todas as cepas analisadas cerca de 20% apresentaram índice enzimático igual ou maior que 2,0. As duas cepas que apresentaram maiores índices enzimáticos foram A05.4 e A06.14

A partir dos resultados nota-se que as cepas que apresentaram os maiores i.e. obtiveram menor diâmetro de colônia em relação às outras cepas com índice enzimático menor. Tomando como referência as cinco cepas que apresentaram maior índice enzimático, notamos que o diâmetro não ultrapassou 10mm, no extremo se encontra a cepa A01.3 com apenas 1,2 mm de diâmetro. A média de diâmetro das 10 cepas com maior i.e. foi de 9,0mm, enquanto que a média de diâmetro das outras cepas com menor i.e. foi de 21,1mm, apresentando no extremo a cepa A01.5 com 43mm. No caso das cepas que não apresentaram formação de halo, a média de diâmetro foi de 28,4mm.

Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que, dentre as cepas estudadas, algumas se destacaram das demais, quanto ao potencial para produção de celulase, principalmente as cepas que apresentaram índice enzimático maior que 3,0 (Tabela 1).

Comparando os dados do presente estudo com os obtidos por Ruegger e Tauk-Tornisielo [6], onde a cepa de *Penicillium herquei*, que apresentou maior índice enzimático, obteve diâmetro de colônia de 2 mm e índice enzimático 6 e entre as cepas que apresentaram maior diâmetro de colônia, está *Trichoderma harzianum* com um índice enzimático de 1,1. Dessa forma nota-se que os resultados também mostraram que a cepa com o maior índice enzimático apresentou um diâmetro de colônia menor em relação às outras cepas analisadas.

Portanto, ao se avaliar as cepas para selecionar uma como boa produtora de enzima celulolítica, não se deve ter como referência somente os dados sobre o índice enzimático, mas também deve-se levar em consideração o crescimento do microrganismo no meio de cultura.

O conhecimento da diversidade biológica e funcional do complexo ecossistema manguezal é de grande relevância para se entender a dinâmica de cadeias envolvidas no sistema [4]. Destaque-se, porém, a importância da realização de estudos futuros para um maior conhecimento sobre a biodiversidade e as funções exercidas por estes microrganismos em ambientes terrestres e de suas interações com fatores bióticos e abióticos dentro de um ecossistema [6].

Conclusões

Os dados preliminares do presente estudo apontam o potencial que fungos isolados do ecossistema mangue apresentam, pois os resultados encontrados estão correlacionados diretamente com a grande biodiversidade fúngica existente naquele tipo de solo.

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 Sapiroanga.

Referências

- [1] SANTOS, E; CASALI, M. S.; OLIVEIRA, L. A. & PIETRO, R. C. L. R. [Online]. *A influência do pH, temperatura e tempo na determinação da atividade de celulase*. Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara. Homepage: <http://www.jfunesp.com.br/Trabalhos/far01.pdf>
- [2] MACIEL, G.M. 2006. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- [3] NG, P. K. L. & SIVASOTHI, N. 1999. *A Guide to the Mangroves of Singapore I (Plant Diversity)*. Singapore Science Centre, 168p.
- [4] TRIERVEILER-PEREIRA, L.; MARCON-BALTAZAR, J.; CAMPOS-SANTANA, M.; GERLACH, A.; HÜTTNERBEKAI, L. & LOGUERCIO-LEITE, C. 2007 [Online]. *Diversidade de fungos xilófilos em três manguezais da ilha de Santa Catarina, SC: uma abordagem Ecológica*. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG. Homepage: <http://seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/1685.pdf>
- [5] GOMES, D.N.F. 2007. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco*. Tese. (Doutorado em Biologia de Fungos) – Departamento de micologia, Centro de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.
- [6] RUEGGER, M.J.S. & TAUKE-TORNISIELO, S.M. 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 27(2): 205-211.
- [7] THEATHER, R. M. & WOOD, P. J. 1982. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and environmental microbiology*. 43(4): 777-780.

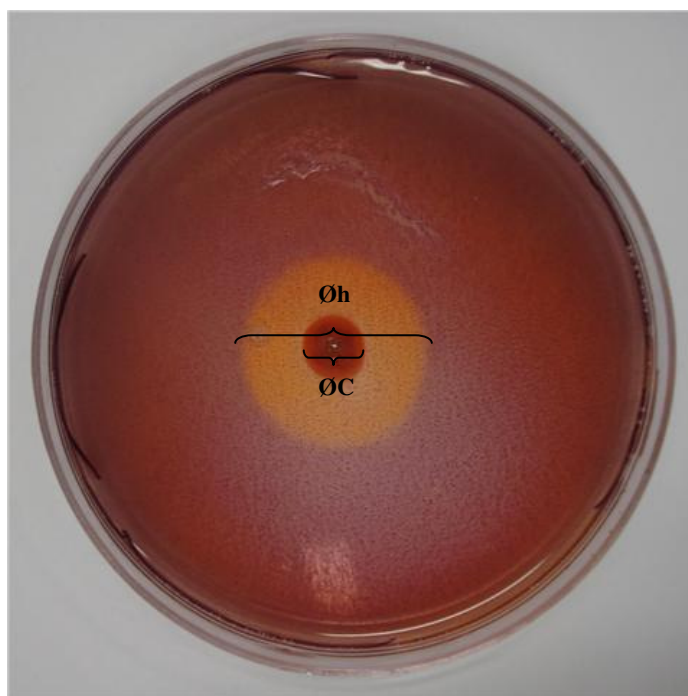


Figura 1 – Placa de Petri com fungo após o teste para avaliação do índice enzimático, evidenciando o halo de hidrólise. (øc = diâmetro da colônia; øh = diâmetro do halo).

Tabela 1: Atividade da celulase de cepas de fungos isolados do solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiroanga.

Amostras	Ø C	Ø h	IE
A06.5	3,0	3,0	1,00 a
A03.10	41,7	41,7	1,00 a
A06.3	28,7	28,7	1,00 a
A06.7	24,3	24,3	1,00 a
A06.9	11,0	11,0	1,00 a
A06.1	40,0	40,0	1,00 a
A06.6	39,7	39,7	1,00 a
A05.6	39,3	39,3	1,00 a
A05.5	27,3	27,3	1,00 a
A03.8	29,0	29,0	1,00 a
A03.5	29,7	31,7	1,07 ab
A06.2	31,0	33,3	1,07 abc
A04.1	15,3	18,0	1,09 abcd
A06.10	31,0	34,7	1,12 abcd
A03.6	28,0	36,3	1,16 abcde
A01.1	15,7	18,3	1,17 abcde
A05.2	15,3	18,0	1,17 abcde
A06.12	20,7	24,7	1,19 abcdef
A03.1	26,3	31,7	1,20 abcdef
A03.9	14,7	18,0	1,23 abcdefg
A01.5	35,0	43,0	1,23 abcdefg
A04.2	16,2	20,3	1,26 abcdefg
A05.8	16,0	20,3	1,27 abcdefg
A06.13	18,0	23,0	1,28 abcdefg
A03.4	28,0	36,3	1,30 abcdefg
A05.1	22,7	29,7	1,31 abcdefg
A01.6	17,0	23,0	1,35 bcdefg
A03.3	16,7	23,3	1,41 cdefg
A06.4	20,7	28,7	1,43 defg
A01.2	16,3	24,0	1,47 efg
A01.4	16,7	24,7	1,48 efgh
A02.1	21,0	31,0	1,48 efgh
A06.8	25,3	38,3	1,51 fgh
A03.7	15,7	24,3	1,55 ghi
A02.2	14,3	26,0	1,81 hij
A03.2	13,0	24,0	1,85 ij
A04.4	12,0	24,0	2,01 jl
A05.3	10,0	20,7	2,07 jlm
A02.3	11,7	24,3	2,10 jlm
A04.3	11,5	25,7	2,23 lm
A01.3	1,2	27,8	2,39 mn
A06.11	4,3	11,3	2,62 n
A05.7	9,7	25,3	2,63 n
A06.14	9,0	27,0	3,00 o
A05.4	8,0	24,0	3,02 o

øc=diâmetro da colônia(mm); øh=diâmetro do halo(mm);
Ie=índice enzimático; (-)=não produziu halo. Médias seguidas
pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre
si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

