

MACROFUNGOS (AGARICOMYCETES) COM POTENCIAL LIGNOCELULOLÍTICO

Jéssica Souza da COSTA¹; Maria Aparecida de JESUS²; Ana Tana Nascimento Rosa³
¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora INPA/CPFF; ³Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA

1. Introdução

Os macrofungos, entre os quais se inclui os Agaricomycetes, são multicelulares e eucariontes, podendo atuar como simbioses, saprófitos e patógenos de animais ou plantas. Além de serem eficazes na deterioração de resíduos agroflorestais devido ao seu complexo enzimático que despolimeriza a lignina, celulose e hemicelulose, componentes primários da madeira (Barillari 2002). Atualmente a busca por microrganismos que apresentem potencial para remover compostos tóxicos do ambiente tem se intensificado. Neste sentido, dentre os fungos, os Agaricomycetes por apresentar sistema enzimático ligninolítico são alvos de estudos promissores, visando espécies com alto potencial de descontaminação ambiental. Correlacionando à capacidade do fungo de descolorir o corante com a potencialidade em degradar xenobióticos, foi sugerida inicialmente por Glenn e Gold (1983) e se estabeleceu a utilização de corantes para determinar a atividade ligninolítica de macrofungos degradadores de compostos xenobióticos, metodologia amplamente utilizada para o Remazol Brilliant Blue (RBBR), corante derivado de antracenos, o que permite avaliar qualitativamente a formação de halo de descoloração.

No âmbito biotecnológico, os Agaricomycetes com alta atividade lignolítica têm sido explorados para diversas finalidades. O objetivo do presente trabalho foi o estudo das espécies com alto potencial lignocelulolítico, propondo isolar e identificar taxonomicamente os macrofungos, visando à obtenção do maior número de isolados puros e viáveis. Assim como, verificar quais linhagens apresentam potencial degradativo do corante Remazol Brilliant Blue (RBBR).

2. Material e Métodos

2.1. Área de Coleta

Os macrofungos foram selecionados visualmente em condições de campo, através da intensidade de degradação do substrato e do tipo de podridão. Os fungos foram coletados em uma construção de Maçaranduba (*Manikara huberi* Ducke), abandonada na área florestal do Hotel Berro de Água, localizado em Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas e nos substratos lignocelulolíticos, tais como árvores vivas e mortas, galhos e troncos caídos próximos do local. Os macrofungos foram coletados nos mesmos tipos de substratos do Campus do INPA e em área de conservação do Instituto Federal do Amazonas (IFAM). Os basidiocarpos foram transportados para o Laboratório de Patologia da Madeira/CPFF. Os espécimes foram secos em ambiente natural e quando necessário na estufa por 20 minutos a 45°C com circulação de ar. As exsiccatas dos fungos foram depositadas na Coleção de Macrofungos Lignocelulolíticos – Coordenação de Pesquisa em Produtos Florestais/INPA.

2.2. Isolamento de macrofungos

Todos os macrofungos que apresentavam potencial lignocelulolítico foram submetidos aos processos de isolamento. Primeiramente, os macrofungos foram observados sob lupa, visando obter fragmentos da parte do corpo de frutificação livre de contaminação de outros fungos, bactérias ou de insetos, e da área de transição da madeira, entre a parte sadia e aquela atacada pelo fungo. Enquanto que o fragmento de Agaricales foi retirado da lamela e do estipe do basidiocarpo. Os fragmentos foram desinfetados em solução de hipoclorito de sódio 0,2% por cinco minutos, seguindo de lavagem em água destilada e esterilizada. Quatro fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultivo extrato de malte-ágar. As placas de Petri foram mantidas em incubadora a 25 °C, visando o crescimento dos fungos. Sucessivas repicagens do micélio foram feitas, com intuito de se obter cultura pura. As características das colônias como cor e o aspecto do micélio, produção de pigmento,

modificação do meio, dentre outras características foram fotografadas e registradas. As fotos foram incorporadas ao banco de imagem da coleção de cultura.

Foram utilizados dez isolados: duas culturas de *Auricularia*, três de *Xylaria*, quatro cultura de Agaricomycetes e de *Fomitella* sp. Além destas, foram acessadas na Coleção de Culturas de Fungos Lignocelulolíticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, as cepas de *Lentinus strigosus* Fr. e *Trametes vilosa* (Sw.) Kreisel, sendo que a última foi testada como controle.

2.3.1. Indução a frutificação dos Macrofungos

Inicialmente, 250 g de Serragem e palha de côco foram colocados em frascos e autoclavados três vezes a 121 °C, a pressão de 1 atm. Após resfriamento a temperatura ambiente e em condições assépticas, 25 ml de meio líquido foi vertido sobre os substratos. Quatro inóculos de tamanhos padronizados do fungo foram colocados em cada substrato. Os frascos foram mantidos à 28°C, visando à frutificação dos macrofungos e a confirmação da espécie.

2.3.2. Avaliação da atividade lignocelulolíticos de Macrofungos em meio sólido com Remazol

Para o bioensaio, adotou-se o método descrito por Borokhov e Rothenburger (2000), usando 0,25 g de remazol em 500 ml de meio de cultura de extrato de malte-ágar esterilizado. Após a solidificação do meio, quatro inóculos do fungo foram colocados sobre o meio de cultura. Como testemunha utilizou-se o *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel (LPM, 408). As culturas foram mantidas à 28°C e a formação do halo de descoloração do RBBR foi observado a cada três dias até o crescimento dos fungos em toda a placa de Petri.

2.4. Identificação dos Macrofungos

Na classificação dos macrofungos foram usadas chaves dicotômicas e descrições das espécies de macrofungos, elaboradas por Cunningham (1963), Dennis (1970), Ryvardeen e Johansen (1980), Guzman (1984), Ryvardeen e Gilbertson (1994) dentre outras.

3. Resultados e discussão

Um total de cinquenta fungos foi coletado no município de Presidente Figueiredo- AM, no Instituto Federal do Amazonas (IFAM) e no Campus do INPA. Os macrofungos estão distribuídos nas famílias: Auriculariaceae, Corticiaceae, Ganodermataceae, Hymenochaetaceae, Lentinaceae, Meuruliaceae, Podoscyphaceae, Polyporaceae e Schizophyllaceae. As espécies da maioria dos macrofungos cresceram em galhos e troncos e vigas, com destaque *Fomitella* sp que cresceu nas vigas e *Trametes modesta* (Kunze ex Fr.) Ryv. também nas vigas e troncos caídos. *Perenniporia medulla-panis* (Jacq.) Donk atacou as vigas. *Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat. que atacou a maioria dos pilares e vigas, é um fungo descrito como decompositor recorrente de madeira de angiospermas (Costa *et al.* 2009).

Schizophyllum commune Fr. coletado em árvore viva, é um fungo de podridão branca com ampla distribuição, possui aplicações medicinais além de ser apreciado na culinária da América Central (Franco-Molano *et al.* 2005). *Ganoderma lucidum* (Cútis) P. Karst. e *Ganoderma* spp. coletados em árvore mortas, são fitopatogênicos. *G. lucidum* é amplamente utilizado no Oriente devido as suas atividades biológicas, nas quais incluem-se terapia de tumores malignos e estímulos ao sistema imunológico (Fortes e Novaes 2006). *Auricularia fuscusuccinea* (Mont.) Henn. encontrada em tronco, este fungo é consumido por diversos grupos indígenas do Brasil e da Colômbia (Franco-Molano *et al.* 2005).

Um grande número de macrofungos com potencial lignocelulolítico foi submetido ao processo de isolamento. No entanto, somente cinco linhagens de Agaricomycetes e de *A. fuscusuccinea* foram obtidas e de *Xylaria* que cresceram na maioria das placas de Petri como contaminante. Essas linhagens foram selecionadas devido ao fato que *Xylaria* apresenta alta atividade lignocelulolítica (Tovar *et al.* 2007).

Com relação à degradação do corante RBBR pelos macrofungos, listados na Tabela 1. *T. villosa* degradou totalmente o RBBR, o que era esperado, em vista que este fungo apresenta potencial para degradação de compostos organoclorados (Yamanaka *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2010). Em função desta atividade este fungo pode ser usado na biorremediação de solos contaminados (Machado *et al.* (2005). *L. strigosus* cresceu rapidamente e ao mesmo tempo

descoloriu o corante RBBR ao final dos dozes dias de incubação (Figura 1). Os isolados de *Auricularia* cresceram rápido e descoloriram o remazol (Figura 2). Esses dados corroboram com os realizados com corantes cromogênicos, sendo que *Auricularia* degradou corantes, principalmente o corante Congo red (Jo *et al.* 2010).

Enquanto que os isolados de *Xylaria* também cresceram rapidamente no meio, degradando lentamente o remazol, o que não era esperado, tendo em vista que espécies de Ascomicetos são reportadas como produtoras promissoras de lacase, enzima lignolítica capaz de oxidar uma grande variedade de compostos xenobióticos (Liers *et al.* 2007).

Dentre os Agaricomycetes testados, o isolado (LPM 1511) apresentou um crescimento muito lento, absorvendo somente o corante e não degradando-o, com isso a colônia tornou-se azul. O halo de descoloração do remazol ao redor da colônia não foi observado em nenhuma dos macrofungos testados, conforme descrição de (Bononi 1998). Entretanto, a degradação do corante pode ser visualizada no reverso da placa de Petri limitando-se ao crescimento micelial. Este fato merece uma melhor investigação.

Com respeito à indução de frutificação dos macrofungos em palha de côco e serragem, ambos *T. villosa* e *L. strigosus* colonizaram rapidamente os dois substratos confirmando seu potencial lignocelulolítico. Os outros fungos colonizaram lentamente os dois substratos e nenhum corpo de frutificação ainda se desenvolveu. Somente o isolado (LPM 1510) não cresceu em nenhum dos substratos indicando que possivelmente este fungo não se adequou ao material lignocelulolítico testado.

Tabela 1 - Avaliação do crescimento micelial e da degradação do corante RBBR pelos macrofungos.

Táxon	Nº da cultura	Descoloração/ RBBR	Crescimento da cultura
<i>Fomitella</i> sp	1513	+	1
<i>Lentinus strigosus</i> Fr.	1466	+++	1
<i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel	408	+++	1
<i>Auricularia</i> sp	1508	++	1
<i>Auricularia</i> sp	1509	++	1
Agaricomycetes 1	1510	++	3
Agaricomycetes 2	1511	+	3
Agaricomycetes 3	1512	+	2
Agaricomycetes 4	1514	+	2
<i>Xylaria</i> sp1	1503	+	1
<i>Xylaria</i> sp2	1515	+	1
<i>Xylaria</i> sp3	1516	+	1

Legenda: + baixo; ++ intermediário; +++ intenso; 1 = rápido; 2= intermediário; 3= lento.

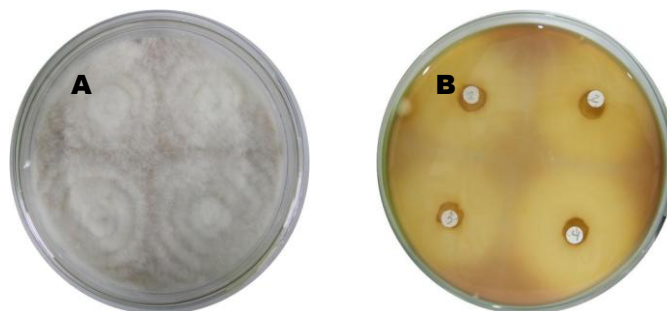


Figura 1 - Cultura de *L. strigosus* (A); nota-se descoloração completa do RBBR no reverso da placa de Petri limitando-se ao crescimento do micelial (B).



Figura 2 - Cultura de *Auricularia* sp (A); nota-se a degradação do RBBR no reverso da cultura (B).

4. Conclusão

L. strigosus e *Auricularia* sp degradaram o corante RBBR, indicando que, estes fungos apresentaram um potencial lignocelulolítico, podendo ser usados em processos biotecnológicos, tais como, biorremediação de ambientes contaminados, biopolpação e despoluição de efluentes têxteis, entre outros. Ambas as espécies são comestíveis. *Xylaria* spp. degradaram pouco o RBBR. Enquanto que a linhagem LPM 1511 não degradou o corante, apenas o absorveu. Nenhum halo de degradação foi observado ao redor do inóculo do fungo. Sugerimos uma melhor investigação deste fato.

Dentre os macrofungos coletados em Presidente Figueiredo, um Polyporaceae provavelmente pode ser espécie nova.

5. Referências

- Barillari, C. T.; 2002. Durabilidade da Madeira do gênero *Pinus* tratada com preservante: avaliação em campo de apodrecimento. Dissertação de Mestrado em Recursos Florestais, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 68pp.
- Bononi, V.L. R.; Grandi, R.A.P. 1998. *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Instituto de Botânica, São Paulo, SP. p.68-105.
- Borokhov, O.; Rothenburger, S. 2000. Rapid dye decolorization method for screening potential wood preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 5457-5459.
- Costa, Â.C. F.; Marino, R. H.; Silva, G. A.; Almeida, T. Á.; Nascimento, K.S.; Mesquita, J.B. 2009. Ocorrência de Fungos Macroscópicos em Povoamentos de Eucalipto, *Acta Forestalis*, 1(1): 6-18.
- Cunningham, G. H. 1963. The Thelephoraceae of Australia and New Zealand. *Dep. Scie. and Ind. Res.* Wellington. 359p.
- Dennis, R. W. G. 1970. Fungus flora of Venezuela and adjacent countries. *Kew Bulletin Additional Series III*. London, 3: 1- 531.
- Fortes, R.C.; Novaes, M. R. C. G. 2006. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Revista Brasileira Cancerol*. 52(4): 363-371.
- Franco-Molano, A.E.; Vasco-Palacios, A.M.; López-Quinteiro, C.A.; Boekout, T. 2005. Macrohongos de la Región Del Médio Caquetá-Colombia. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 210pp.

Glenn, J. K.; Gold, M. H. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degradating basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6): 1741-1747.

Guzman, G. 1984. Identificación de los Hongos, Comestibles, Venenosos, Alucinantes y destructores de la madera. México, Limusa. 452 pp.

Jo, W.S.; Bae, S.H.; Choi, S.Y.; Park, S.D; Yoo, Y.B.; Park, S.C.2010. Development of Detection for Cellulolytic Activity of *Auricularia auricularia-judae*. *Mycobiology*, 38(1):74-77

Liers, C.; Ullrich, R.; Pecyna, M.; Schlosser, D.; Hofrichter, M. 2007. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 785-793

Machado, K. M. G.; Matheus, D. R.; Bononi, V. L. R. 2005. Lignolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal Microbiology* [online], 36 (3):246-252.

Oliveira, L. H. S.; Barreto, M. B.; Vitalli, V. M. V.; Machado, K. M. G.; Matheus, D. R. 2010. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. *Naturalia*. (33): 85-99.

Ryvarden, L.; Gilberston, R. L. 1994. *European Polypores*. Fungiflora, Oslo. v. 2, p.388 – 743.

Ryvarden, L. & Johansen, I. 1980. A Preliminary Polypore Flora of East Africa. Fungiflora. Oslo. 636p.

Tovar, D. C.; Rosales, D.A.; Díaz, S.E.G.2007. Pudrición de raíz por *Xylaria* Hill: Grez., p 240. In: Tovar, D. C.; Rosales, D.A.; Díaz, S.E.G. *Enfermedades Forestales en México*. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.

Yamanaka, R; Soares, C. F.; Matheus, D. R. Machado, K.M.G. 2008. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39 (1).