

ISOLAMENTO DE FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Jéssica Souza da Costa¹; Maria Aparecida de Jesus²; ¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPPF/INPA;

1. Introdução

Segundo Espósito e Azevedo (2004), os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. Os Basidiomicetos são altamente eficientes no processo de decomposição de materiais lignocelulolíticos, são popularmente conhecidos como cogumelos ou orelhas de pau. Devido a sua capacidade em decompor substratos podemos considerá-los organismos indispensáveis, afinal eles atuam como recicladores naturais, esta capacidade de biodegradação se deve a um complexo enzimático que é capaz de degradar os componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina), em função desta atividade lignocelulolítica, os Basidiomicetos despertam grande interesse industrial devido a sua aplicabilidade em processos biotecnológicos tais como: biopolpação, tratamentos de solos contaminados e produção de etanol, dentre outros (Costa, 1993; Blanchette, 2000; Hyodo *et al.*, 2000). Atualmente, o acervo não dispõe de linhagens suficientes para atender a demanda de espécies com potencial biotecnológico gerada pelas instituições de pesquisa e ensino. No sentido de aumentar a oferta, principalmente de fungos lignocelulolíticos, selecionou-se em condições de campo, aqueles que apresentavam alto potencial de degradar madeira, visando incremento de culturas.

2. Material e Métodos

Primeiramente, foram selecionados visualmente os fungos que poderiam apresentar alto potencial lignocelulolítico, através da intensidade da degradação do substrato e do tipo de podridão. Os fungos foram coletados em diferentes localidades: Campus do INPA, Manaus, Estação Biológica do Uatumã e Reserva Florestal Adolpho Ducke. Foram feitas anotações sobre o substrato e o habitat em que o fungo foi encontrado. Também, os dados sobre a coloração, forma, consistência e as dimensões (largura e o diâmetro) do píleo e do estipe foram registrados. Após a coleta, basidiocarpos foram transportados para o Laboratório de Patologia da Madeira/CPPF. Os espécimes foram secos em ambiente normal e quando necessário na estufa por 20 minutos a 45°C com circulação de ar. As exsicatas dos fungos estão depositadas na Coleção de Macrofungos Lignocelulolíticos – CPPF/INPA.

Os macrofungos foram observados sob lupa, visando obter fragmentos de corpo de frutificação livre de contaminação de outros fungos, bactérias ou de inseto. Esses fragmentos foram retirados 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 corpo de frutificação. Os fragmentos dos fungos foram colocados em uma placa de Petri e assépticamente foram desinfetados em solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 3 min, seguindo-se de imersão, lavagem em água deionizada-esterilizada e secos em papel-absorvente estéril. Dois ou três fragmentos foram colocados em placas de Petri contendo meio malte-ágar ou batata-dextrose-ágar (BDA). As placas de Petri foram mantidas em incubadora a 25 °C, visando o crescimento dos fungos e sucessivas repicagens até a obtenção de cultura pura. A partir desta cultura, inóculos foram armazenados em três diferentes métodos de preservação (baixa temperatura, óleo mineral e sílica). As características das colônias como cor e o aspecto do micélio, produção de pigmento, modificação do meio, dentre outras foram fotografadas. As fotos serão incorporadas ao banco de imagem e culturas depositadas na Coleção de Culturas de Microorganismos de Interesse Agrossilvicultural-INPA.

Na identificação dos fungos foram observadas as estruturas macroscópicas (forma, cor e consistência do corpo de frutificação) e microscópicas (sistema de hifas, tamanho, cor e ornamentação dos esporos) e usadas chaves dicotômicas e descrições das espécies de macrofungos, elaboradas por Cunningham (1963), Dennis (1970), Eriksson *et al.* (1978,1981), Guzman (1984), Hjortstam *et al.* (1987, 1988), Gilbertson e Ryvarden (1986, 1987), Ryvarden e Gilbertson (1993, 1994), Ryvarden e Johansen (1980), dentre outras.

3. Resultados e Discussão

Um total de dezenove macrofungos apresentou evidências de altas atividades lignocelulolíticas em condições de campo. Foram obtidas culturas de representantes de Agaricales, Auriculariaceae, Corticiaceae e Polyporaceae e Basidiomicetos (Tabela 1.). Dentre os Poliporóides, *Oxyporus pellicula* (Jungh.) Ryv. e *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill.

Do ponto de vista biotecnológico, *P. sanguineus* possui a capacidade de degradar enzimaticamente a lignina. Tais enzimas são de interesse em muitas atividades industriais e de pesquisa, destacando-se o tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose e na biorremediação de solos contaminados, dentre outras (Silva *et al.*, 2006). Também, isolados deste fungo são utilizados em testes de durabilidade natural de madeira e bioatividade de plantas, (Jesus e Abreu, 2002). Dentre os Basidiomicetos também foram isolados, *Lentinus stigellus* Berk., *Auricularia delicata* (Fr.) Henn., conhecidos como comestíveis. *L. stigellus* tem potencial de produzir compostos antimicrobianos, enquanto que *A. delicata* é comestíveis com alto valor nutricional. Além destes, isolou-se cinco fungos que degradaram barronetes de Maçaranduba (*Manilkara Huberi*), madeira de alta resistência natural, que foi testada por dez anos em condições de campo, com intuito de uso desta madeira em construção. Estes fungos não apresentam frutificações definidas o que dificulta a identificação taxonômica. A cultura do Basidiomiceto (LPM 1473) apresenta uma coloração do meio de cultura vermelho-rubi que provavelmente seja resultante da liberação de pigmento desta cor (Foto1). Tal informação deverá ser confirmada em futuros estudos, tendo em vista que atualmente se têm buscado microorganismos que produzam biocorantes, a fim de substituir pigmentos sintéticos (Esposito *et al.*, 2010). *Tinctoporelus epimieltinus* (Berk.) Ryv., Agaricales (2), e Corticiaceae não se desenvolveram nos meios de cultivos usados. Provavelmente, esses fungos requerem meios específicos. A partir de fragmentos de Basidiomicetos e da madeira, obtivemos fungos considerados contaminantes, tais como *Trichoderma* sp (PLM, 1478), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl (PLM, 1463), *Xylaria* sp (PLM, 1480) e *Coelomomyces* (PLM, 1479). Algumas espécies de *L. theobromae* são fitopatogênicas atacam várias frutíferas tropicais, afetando cultura de interesse econômico (Barros *et al.*, 2009). *Trichoderma* ocorre naturalmente nos solos e são considerados antagonistas eficientes contra fitopatógenos de importância econômica e como promotor de crescimento de plantas. Também, algumas espécies vêm sendo utilizadas em estudos visando etanol (Jesus *et al.*, 2008). Este fungo tem grande aplicabilidade ambiental. *Xylaria*, fungo endofítico (Ascomycetos), produz metabólitos de relevância econômica, como a citocalasina e substâncias bioativas, tais como bactericida, fitotóxica e anticancerígena, entre outras (Silva e Esposito, 2010).

4. Conclusão

A identificação taxonômica dos fungos isolados é de fundamental importância, pois no permite conhecer a espécie e as suas potencialidades.

Dentre os isolados podemos destacar *P. sanguineus* que é amplamente estudado devido suas aplicabilidades biotecnológicas e tecnológicas. A linhagem de um Basidiomiceto não identificado que provavelmente produz biocorante. Isolados de fungos considerados contaminantes como *Trichoderma* sp, *L. theobromae* e *Xylaria*, foram depositadas na coleção tendo em vista o potencial bioeconômico que eles apresentam, principalmente *Trichoderma* que tem maior demanda para pesquisa em etanol.

A maior dificuldade de se obter culturas de Basidiomicetos se deve ao fato que eles são muito exigentes quanto ao meio nutritivo. Sugere-se futuros isolamentos usando diferentes meios de cultivos seletivos. Também, a preservação e identificação das culturas requerem informações ainda não disponíveis.

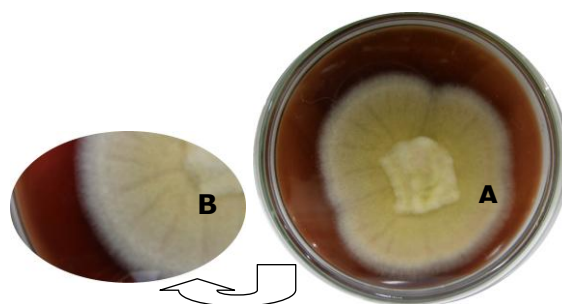


Figura 3. Aspecto do Basidiomiceto (LPM 1473); nota-se um halo de cor vermelho- rubi ao redor da colônia (A);

limite entre o micélio e o halo do biocorante (B).

Tabela 1. Relação dos isolados de macrofungos de diferentes localidades.

Táxon	Isolados	Procedência
<i>Lentinus stigellus</i> Berk.	1464	INPA Campus I
<i>Pleurotus sp</i>	1471	Campus INPA I
<i>Agaricales 1</i>	—	INPA Campus I
<i>Agaricales 2</i>	1470	Reserva Biológica Uatumã
<i>Megagasporia carvermosa</i> (Berk.) Ryv.	—	R. F. Adolpho Ducke
<i>Oxyporus pellicula</i> (Jungh.) Ryv.	—	Reserva Biológica Uatumã
<i>Oxyporus sp.</i>	—	Reserva Biológica Uatumã
<i>P. sanguineus</i> (L.) Murr.	1469	Manaus
Polyporaceae 1	—	R. F. Adolpho Ducke
Polyporaceae 2	—	Campus INPA I
Polyporaceae 3	—	Reserva Biológica Uatumã
Polyporaceae 4	1475	Reserva Biológica Uatumã
Corticaceae	—	Reserva Biológica Uatumã
<i>Auricularia delicata</i> (Fr.) Henn.	1462	Reserva Biológica Uatumã
Não Identificados	1472	Campus INPA I
Não Identificados	1473	Campus INPA I
Não Identificados	1474	Campus INPA I
Não Identificados	1476	Campus INPA I
Não Identificados	1477	Campus INPA I

5. Referências

Blanchette, R.A. 2000. *A review of microbial deterioration found in archeological wood from different environments*. International Biodeterioration and Biodegradation, 46: 189-204

Barros, C. C.; Marques, M.M.M; Castro, R.A.O; Vieira, I.G.P ;Silva, A.R.A; Morais, S.M. 2009. Fungitoxicidade de Tiofenos Isolados por Clae Sobre *Lasiodiplodia theobromae*. Trabalho apresentado no 49º Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Coelho, N. S.; Jesus, M. A.; Cortez, A. C. 2007. Recuperação do acervo de culturas de fungos lignocelulolíticos. XV Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA.

Costa, A.S. 1993. Pré-tratamento biológico de cavacos industriais de eucalipto para produção de celulose Kraft. Dissertação de Mestrado em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 115 pp.

Cunningham, G. H. 1963. The Thelephoraceae of Australia and New Zealand. Dep. Scie. And Ind. Res. Wellington. 359pp.

Dennis, R. G. 1970. Fungus of Venezuela and Adjacent Countries. London. Her Majesty's Stationery Office. 531pp.

Durán, N.; Teixeira F.S.M.; Espósito, E. 2010. Pigmentos fúngicos e seu potencial biotecnológico. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L.; Fungos Uma Introdução a Biologia,

Bioquímica e Biotecnologia. 2ª Ed. revisada e ampliada. Universidade Federal Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. p. 280-307

Eriksson, J., Hjortstam, K., Ryvarde, L. 1978. *The Corticiaceae of North Europe*. Fungiflora. Oslo. 5: 889-1049.

Eriksson, J., Hjortstam, K., Ryvarde, L. 1981. *The Corticiaceae of North Europe*. Fungiflora. Oslo. 6: 1051-1276.

Espósito, E.; Azevedo, J.L. 2010. Fungos Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Universidade Federal Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. 9pp.

Espósito, E.; Silva, M. 2010. O Papel dos Fungos na Recuperação Ambiental, p 337-375. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. ;. Fungos Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. 2ª Ed. revisada e ampliada. Universidade Federal Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

Gilbertson, R. L.; Ryvarde, L. 1986. *The North American Polypores*. Fungiflora, Oslo. v. 1, 434.

Gilbertson, R. L.; Ryvarde, L. 1987. *The North American Polypores*. Fungiflora, Oslo. v. 2, p. 434-885.

Guzman, G. 1984. *Identificación de los Hongos Comestibles, Venenosos, Alucinantes y Destructores de la Madera*. México, Limusa. 452pp.

Hjortstam, K.; Larsson, K. L.; Ryvarde, L. 1987. *The Corticiaceae of North Europe*. Fungiflora, Oslo. v. 1, p. 1-59.

Hjortstam, K.; Larsson, K. L.; Ryvarde, L. 1988. *The Corticiaceae of North Europe*. Fungiflora, Oslo. v. 8, 1450pp.

Hyodo, F.; Inoue, T.; Azuma, J. I.; Tayasu, I.; Abe, T. 2000. *Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera); (Macrotermitinae)*. Soil Biology and Biochemistry, 32: 653-658.

Jesus, M. A.; Cirino, T. P.; Nascimento, C. S.; Souza, L. A.; Barbosa, A. 2008. Preliminary Data on the antifungal potential of extracts of leguminosa against wood decay fungus In: ECOWOOD'08 3rd International Conference on Environmentally-Compatible Forest Products ed.Oporto – Portugal: Fernando Pessoa University, p. 157-164

Jesus, M. A.; Abreu, R. L. 2002. S. Durabilidade Natural da madeira de Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). I Fungos. Acta Amazonica, 32(4): 663 - 675.

Ryvarde, L.; Gilbertson, R. L. 1993. *European Polypores*. Fungiflora, Oslo. v.1, p. 1- 387.

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

Ryvarde, L.; Johansen, I. 1980. *A Preliminary Polypore Flora of East Africa*. Fungiflora. Oslo. 636p.

Silva, A.C.; Ferreira, F. S.; Fonseca, M. D. L.; Roland, I. A. 2006. *Efeito da Fonte de Carbono na Atividade Enzimática dos Fungos Degradadores de Madeira *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp.* em Cultura sob Agitação*. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, Santa Catarina.