

Atividade Celulolítica de Fungos Isolados da Rizosfera de Cactáceas no Município de Ouro Branco, Semiárido Alagoano

Arthur Costa Pereira Santiago de Almeida¹, Crísea Cristina N. de Cristo¹, Elisama Victória da Silva Melo¹, Saul de Campos Melo Almeida¹, Matus Nascimento da Silva¹, João Manoel da Silva², Tania Marta Carvalho dos Santos¹, Yamina Coentro Montaldo¹

¹Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. E-mail: arthurc995@gmail.com; criseacncristo@gmail.com; sama.melofrg@gmail.com; saulmelo10@gmail.com; matus3174@gmail.com; taniamarta2@gmail.com; ycmzte11@gmail.com

²Rede Nordeste de Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. E-mail: joao.manoel@iqb.ufal.br

Resumo: O solo, por sua condição natural, é um ambiente propício a uma vasta diversidade de organismos. Parte desses micro-organismos vive em simbiose com várias espécies de plantas cultivadas ou não, e que têm potencialidades na produção vegetal e de hidrólises enzimáticas. Na região de Ouro Branco-AL foi realizado um estudo objetivando isolar de uma área sob processo exponencial de salinização e desertificação, fungos filamentosos associados a cactáceas e avaliar sua atividade celulolítica. Foi realizada coleta de solo na profundidade 0-20 cm da superfície na área correspondente à rizosfera. Diluições seriadas foram realizadas até a fração 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} e inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultivo seletivo para fungos. Foram selecionados cinco fungos para serem determinadas a atividade celulolítica em meio carboximetilcelulase e a degradação em papel filtro. Os ensaios demonstraram atividade celulolítica dos isolados através da colonização e degradação de papel filtro.

Palavras-chave: fungos filamentosos, hidrólises enzimáticas, desertificação, atividade celulase.

Cellulolytic Activity of Fungi Isolated from Cacti Rhizosphere in the Municipality of Ouro Branco, Alagoan Semiarid

Abstract: The soil, by its natural condition, is an environment conducive to a wide diversity of organisms. Part of these microorganisms lives in symbiosis with various species of plants cultivated or not, and which have potential in plant production and enzymatic hydrolysis. In the region of Ouro Branco-AL, a study was carried out to isolate an area under exponential salinization and desertification process, filamentous fungi associated with cactaceas and to evaluate its cellulolytic activity. Soil was collected at a depth of 0 to 20 cm from the area corresponding to the surface. Serial dilutions were made to fractions 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} and inoculated into Petri dishes, including selective fungal culture medium. Five fungi were selected to be used for cellulolytic activity in carboxymethylcellulase medium and degradation in filter paper. The tests demonstrated the cellulolytic activity of the users through the colonization and degradation of the filter paper.

Keywords: filamentous fungi, enzymatic hydrolysis, desertification, cellulase activity.

INTRODUÇÃO

A vegetação do Semiárido é constituída por várias espécies, sendo as Cactaceae consideradas endêmicas dessa região, porém essa paisagem tem sofrido com o crescimento exponencial da degradação ambiental, especialmente no que se refere ao solo (Silva et al., 2018). O

solo, por sua condição natural, é um ambiente propício a uma vasta diversidade de organismos. Parte desses micro-organismos vive em simbiose com várias espécies de plantas cultivadas ou não, e que têm potencialidades na produção vegetal e de hidrólises enzimáticas.

A celulose é o carboidrato mais abundante do planeta e o principal

polissacarídeo constituinte da parede celular vegetal. A degradação microbiana desse carboidrato tem incentivado a prática das fermentações celulolíticas de forma artificial, levando em consideração que para fins industriais os demais componentes da parede celular das plantas, pectina, hemicelulose e lignina são considerados geradores de impureza. Na natureza, esses processos são responsáveis pela maior parte de carbono disponível para o solo (LYNCH et al., 1981; SHODA; SUGANO, 2005).

Os solos de maneira geral estão repletos de micro-organismos que produzem enzimas celulasas, contudo nem todos podem ser considerados celulóticos, apenas aqueles que são capazes de degradar a celulase natural. Para conhecer esses seres vivos os testes em laboratório utilizam-se de alguns substratos indutores capazes de medir a atividade celulolítica, algodão e papel de filtro são exemplos (ROBSON; CHAMBLISS, 1989).

Além disso, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) afirmam que os micro-organismos constituem excelentes indicadores das condições biológicas do solo, apresentando ainda promoção de crescimento vegetal, por isso torna-se importante o conhecimento da diversidade de população microbiana e sua capacidade biotecnológica para fomentar dados que corroborem para ações que contribuam para meios de recuperação de solos em processo de salinização e desertificação, especialmente para desenvolvimento agrário (SILVA et al., 2018).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados do Semiárido alagoano em uma área salinizada e desertificada, em meio de cultura sintético e papel filtro.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir de um estudo sobre fungos filamentosos associados a cacatáceas e sua atividade celulolítica em uma área sob processo exponencial de salinização e desertificação na região de Ouro Branco-AL, as amostras de solo foram coletadas em dois pontos da zona rural desse município. Os pontos de coleta foram

registrados por meio do uso de do equipamento *Global Processing System* (GPS) (Ponto A O: 37° 24' 45,9" S: 9° 4' 47,3"; Ponto B O: 37° 24' 51,0' S: 9° 4' 38,3").

De cada ponto foram coletadas amostras na profundidade 0-20 cm a partir da camada superficial da rizosfera de *O. cochenillifera*. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel pardo, identificadas e encaminhadas ao laboratório de microbiologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Para o isolamento foi adotado o método de diluição seriada decimal seguida de plaqueamento em meio de cultivo microbiano seletivo. Os fungos foram isolados por meio de diluição seriada decimal (10^{-3}), com plaqueamento em meio de cultura de Martin.

Com o auxílio de uma alça de platina, fragmentos das linhagens dos fungos foram transferidos para o meio de cultura seletivo contendo Carboximetilcelulase (CMC) como única fonte de carbono. O meio de cultura foi composto por 3,0 g de NaNO_3 ; 1,0 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de MgSO_4 ; 0,5 g de KCl; 10,0 mg de FeSO_4 ; 10,0 g de CMC e 18,0 g de ágar para 1000 ml de água destilada. Após três dias de crescimento à temperatura ambiente, as placas foram levadas para incubação em uma estufa para cultura microbiana a 38 °C durante mais três dias. Ao fim desse período, foram adicionados nas placas 5,0 ml de solução corante vermelho congo a 1%. Após 30 minutos a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5,0 ml de solução de NaCl 0,5 M. Revelados a produção de halos, que tiveram seus diâmetros medidos com auxílio de paquímetro.

Foram realizados ensaios para avaliar o potencial celulolítico dos isolados quanto a degradação de papel filtro. Em tubos de ensaio de 15 cm de altura e 1 de diâmetro, foram adicionados 25,0 ml de solução de minerais (NaNO_3 : 3,0 g.L⁻¹; K_2HPO_4 : 1,0 g; MgSO_4 : 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO_4 : 10,0 mg) contendo uma fita de papel filtro com medidas de 10 cm de comprimento e 1 cm de largura. O material foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos e após o resfriamento procedeu-se

a inoculação dos fungos isolados. Após 14 e 21 dias de incubação a temperatura ambiente, as fitas de papel foram avaliadas e atribuídas notas quanto ao seu estado de degradação.

Os resultados de diâmetro do halo foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do software Rstudio (2016) com auxílio da linguagem R (R Team, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo dos fungos em meio de cultura com carboximetilcelulose (CMC)

como única fonte de carbono apresentou formação de halo enzimático, indicando a produção de celulase por todos os isolados. Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida et al. (2014) ao relatar a atividade celulolítica de fungos do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais.

O aparecimento dos halos comprova a presença da enzima celulase. O isolado F14 obteve a maior média para o tamanho do halo entre os isolados testados como também menor desvio padrão, seguido por F12, F04, F11 e F02, respectivamente (Figura 1).

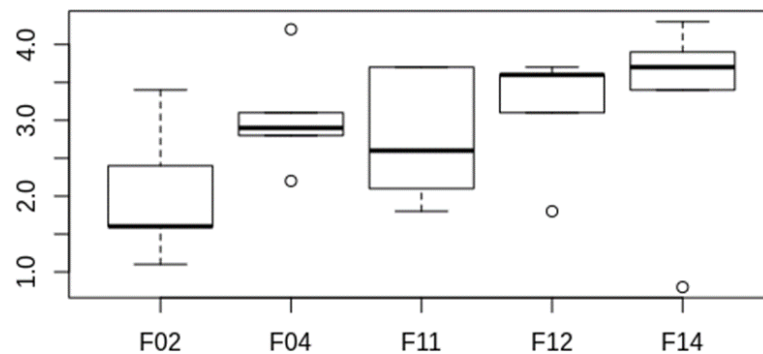


Figura 1 - Diâmetro do halo de fungos rizosféricos crescidos em meio Carboximetilcelulose.

O tamanho dos halos variou entre 0,8 e 4,3cm, diâmetros equivalentes aos encontrados por Souza et al. (2009), essas medições contribuem para seleção de fungos com potencial para atividade celulolítica, constituindo uma ferramenta importante na seleção de micro-organismos capazes de degradar celulose, os quais são alvo de pesquisa na biotecnologia e microbiologia industrial.

A colonização e a degradação do papel filtro foi parâmetro para confirmação da atividade celulolítica dos fungos. Nesse ensaio, foi possível perceber a diferença entre o cultivo dos isolados na fita embebida apenas com caldo de nutriente (Tabela 1), que demonstrou maior atividade degradativa em relação a fita embebida com meio de cultura CMC sem ágar (Tabela 2).

Tabela 1 - Atividade celulolítica dos isolados cultivados em papel filtro e caldo nutritivo por 14 dias a temperatura ambiente.

Isolado	R1	R2	R3	R4	R5
F12	++	++	++	++	++
F04	++	++	+-	++	+-
F14	+-	+-	+-	++	+-
F02	+-	+-	+-	+-	+-
F11	++	+-	++	++	++

* ++ colonização do papel e degradação presente; +- colonização do papel e degradação ausente; -- colonização ausente e degradação ausente.

Tabela 2 - Atividade celulolítica dos isolados cultivados em papel filtro e meio CMC por 21 dias a temperatura ambiente.

Isolado	R1	R2	R3	R4	R5
F12	+-	--	--	--	--
F04	+-	++	--	+-	++
F14	+-	+-	+-	+-	+-
F02	+-	+-	+-	+-	+-
F11	++	+-	++	+-	+-

* ++ colonização do papel e degradação presente; +- colonização do papel e degradação ausente; -- colonização ausente e degradação ausente.

A eficiência na produção de determinadas enzimas por microorganismos do solo e rizosfera são de considerável importância do ponto de vista ecológico, uma vez que estes são capazes de juntamente com a atividade enzimática como a celulase, podem atuar simultaneamente na degradação de compostos tóxicos ao meio ambiente, como é o caso dos agrotóxicos. Assim, Silva et al. (2018) afirmam que fungos filamentosos podem atuar na degradação de agrotóxicos como o Paraquat. Essa habilidade torna os fungos rizosféricos como potenciais agentes de biorremediação do solo.

CONCLUSÕES

Todos os isolados fúngicos avaliados possuem atividade enzimática para degradação de celulase em meio de cultura sintético, devendo ser estudados mais a fundo para com a atividade de outras enzimas e sua total caracterização

para futuras aplicações como biorremediadores do solo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. N. M.; FREITAS, C. E. S.; OLIVEIRA, A.; RIBEIRO, I. C. O.; EDVALDO, A. V.; LUCIANA, G. C.; DUARTE, E. R. Atividade celulolítica de fungos aerobios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. *Revista Caatinga*, v. 27, n. 4, p. 202-207, 2014.

LYNCH, J. M.; SLATER, J. H.; BENNETT, J. A.; HARPER, S. H. T. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology*, v. 127, n. 2, p.231-236, 1981.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology Bioprocess and Engineering*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2005.

SILVA, J. M.; NASCIMENTO, S. P. G.; MASSAHUD, R. T. R.; SANTOS, T. M. C.; LIMA, G. S. de A. Atributos químicos e biológicos do solo: um estudo no semiárido alagoano. In: GOMES, I. A.; MEDEIROS, M. B.; BATISTA, M. C.; GONZAGA, K. S.; FELIX, R. J. S.; SILVA JUNIOR, J. M.; OLIVEIRA, J. P. S. (Org.). *Ensaio Interdisciplinares em Ciências Agrárias no Nordeste no Brasil*. 1ed. Ananindeua: Editora Itacaiúnas, 2019, v. 1, p. 42-50.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. (2018).

RStudio Team RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. (2016). Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.

SILVA, G. M. M.; PINHEIRO, G. C.; BARBOSA, B. C. A.; PEREIRA, L. J. R.; PESSOA, K. A. R. Biodegradação de paraquat e produção de celulase em reatores inoculados com fungos e resíduo lignocelulósico. *Revista DAE*, v. 66, n. 211, p. 50-61, 2018.