

Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil¹

MARCELO J.S. RUEGGER^{2,3} e SÂMIA M. TAU-K-TORNISIELO²

(recebido: 13 de novembro de 2002; aceito: 27 de novembro de 2003)

ABSTRACT – (Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil). Eighty filamentous fungi strains isolated from soil of the Atlantic rainforest in the Banhado Grande, an Ecological Station region of Juréia-Itatins, São Paulo State, Brazil, were analysed concerning their potential to produce cellulolytic enzymes in response to the cellulose presence in the culture medium, as the only carbon source. For this purpose, a staining technique using congo red was employed and the cellulase activity on filter paper (FPase) and carboxymethylcellulose (CMCase) were measured. The fungi were differentiated regarding the activity of these enzymes, because such activity changed with the substrate type and with the methodology used. The best CMCase activity (1.64 U) was obtained with the cultivation of *Trichoderma harzianum* (V) on wheat bran medium after 4 days, at 25 °C. The obtained results did not supply evidences to differentiate any strain that had better cellulase activity in relation to the others. However, they offer information necessary to evaluate whether *Trichoderma* strains: *T. harzianum* III and V, *T. inhamatum* I, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* II, and *T. viride* I, are potentially good producers of cellulase or not.

Key words - Atlantic rainforest, cellulase activity, soil fungi

RESUMO – (Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil). Oitenta fungos filamentosos isolados do solo da Mata Atlântica da região conhecida como Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil, foram analisados para avaliar seus potenciais quanto a 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 e determinada a atividades da celulase em papel de filtro (FPase) e em carboximetilcelulose (CMCase). Os fungos foram diferenciados quanto à atividade dessas enzimas, pois tais atividades variaram em relação ao tipo de substrato e à metodologia aqui utilizados. A melhor atividade CMCase (1,64 U) foi obtida com o cultivo de *Trichoderma harzianum* (V) em meio de farelo de trigo após cultivo por 4 dias, a 25 °C. Os resultados obtidos não forneceram evidências para diferenciar qualquer linhagem que tivesse melhor atividade da celulase em relação às demais. Contudo, sugerem que estudos mais detalhados com as linhagens de *Trichoderma*: *T. harzianum* III e V, *T. inhamatum* I, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* II e *T. viride* I, serão necessários para avaliar se estas são potencialmente boas produtoras de celulase, sob condições adequadas de cultivo.

Palavras-chave - atividade da celulase, fungos de solo, Mata Atlântica

Introdução

Na região do Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI), SP, Brasil, foram realizados estudos sobre fungos filamentosos de solo e da água (Attili 1994, Garlipp 1995, Grandi & Attili 1996, Prada & Pagnocca 1997), leveduras (Pinto 1999) e mais especificamente de Aphyllophorales (Tauk-Tornisielo *et al.* 2000) em diferentes áreas. Esses estudos contribuíram para melhor conhecimento da diversidade da micota nativa dessa região, que possui Mata Atlântica ainda pouco alterada pela ação antrópica.

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 importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas.

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (Bayer & Lamed 1992) e pode ser hidrolisada, com ácidos, a glicose. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem. Na natureza, esses processos representam a maior fonte de carbono para o solo (Lynch *et al.* 1981).

1. Parte da tese de doutorado do primeiro autor.
2. Universidade Estadual Paulista, Centro de Estudos Ambientais, Av. 24-A, 1515, 13506-900 Rio Claro, SP, Brasil.
3. Autor para correspondência: mruegger@hotmail.com

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann *et al.* 1980).

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. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (Robson & Chambliss 1989).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orberg 1981).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da celulase extracelular utilizando fungos filamentosos isolados de solo da região do Banhado Grande, na EEJI, comparando-se os cultivos em meio sintético com carboximetilcelulose, em caldo sintético contendo papel de filtro e em meio de farelo de trigo.

Material e métodos

Foram estudadas 80 linhagens de fungos isoladas por Garlipp (1995) do solo da região do Banhado Grande, na EEJI, SP, constantes da tabela 1. Os fungos, distribuídos em 19 gêneros e 47 espécies foram conservados em ágar extrato de malte (glicose: 20,0 g.L⁻¹; peptona: 1,0 g.L⁻¹; extrato de malte: 20,0 g.L⁻¹; ágar: 20,0 g.L⁻¹) a 4 °C, no laboratório do Centro de Estudos Ambientais, CEA – UNESP, Rio Claro e repicados periodicamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

As linhagens foram cultivadas em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (NaNO₃: 3,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄: 1,0 g.L⁻¹; MgSO₄: 0,5 g.L⁻¹; KCl: 0,5 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O: 10,0 mg.L⁻¹; CMC: 10,0 g.L⁻¹; ágar: 20,0 g.L⁻¹) e somente aquelas que não cresceram nesse meio (tabela 2) foram cultivadas em ágar carboximetilcelulose (KH₂PO₄: 1,0 g.L⁻¹; (NH₄)₂SO₄: 0,5 g.L⁻¹; asparagina: 0,5 g.L⁻¹; KCl: 0,5 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O: 0,2 g.L⁻¹; CaCl₂: 0,1 g.L⁻¹; extrato de leveduras: 0,5 g.L⁻¹; CMC: 10,0 g.L⁻¹; ágar: 20,0 g.L⁻¹). Os inóculos foram obtidos com agulha no centro de placas de Petri. Estas foram incubadas por 4 dias a 28 °C e em seguida

submetidas a choque térmico por 16 h a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g.L⁻¹) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro (Nogueira & Cavalcanti 1996).

Em seguida, as linhagens foram caracterizadas quanto à atividade da celulase utilizando-se papel de filtro (FPase). O ensaio foi realizado em tubos de vidro de 15 cm de altura, em duplicata, contendo uma fita de papel de filtro Whatman n.1, de 10 cm², como única fonte de carbono e 10 mL de caldo sintético (NaNO₃: 3,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄: 1,0 g.L⁻¹; MgSO₄: 0,5 g.L⁻¹; KCl: 0,5 g.L⁻¹ e FeSO₄.7H₂O: 10,0 mg.L⁻¹, pH 5,0), cobrindo 2/3 das fitas. Os tubos, esterilizados, foram inoculados com uma alçada de esporos dos respectivos fungos e incubados por 14 dias a 28 °C. A atividade da celulase em papel de filtro foi determinada no caldo de cultivo obtido no final da incubação, usando-se uma fita de papel de filtro de 6 cm² em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL do caldo e 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após incubação por 60 min a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL do reagente de Sumner (ácido 3,5 dinitro salicílico: 10,0 g.L⁻¹; NaOH: 16,0 g.L⁻¹; tartarato duplo de sódio e potássio: 300,0 g.L⁻¹). Para desenvolvimento da cor, os tubos foram aquecidos por 5 min em banho de água fervente. Os açúcares redutores foram determinados em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda (λ) de 540 nm. As leituras foram comparadas com o tubo do branco do ensaio, obtido nas mesmas condições, contudo, sem inóculo (Attili 1994).

Além das técnicas citadas, observou-se o potencial dos fungos quanto à atividade da celulase em meio de farelo de trigo. Para tanto, frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo farelo de trigo (farelo de trigo: 5,0 g; água de torneira: 5,0 mL) foram inoculados com 1 mL de uma suspensão de 1.10⁷ esporos mL⁻¹ em solução de Tween 80 (1,0 g.L⁻¹). Os frascos permaneceram incubados por 4 dias a 25 °C. Após este período, o extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 30 mL de água destilada a 4 °C nos frascos. Os substratos foram agitados com espátula e permaneceram em repouso por 3 h a 4 °C. O sobrenadante foi separado através de filtração em gaze e algodão, permanecendo congelado até o momento da análise em frascos de vidro tampados e previamente rotulados. Os cultivos foram realizados em duplicata.

Para determinar a atividade CMCase (endoglucanase) utilizou-se tubo de ensaio onde foram adicionados 50 mg de CMC e 4,9 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após equilíbrio térmico em banho-maria por 5 min a 50 °C, adicionou-se 0,1 mL do filtrado da cultura conservado em suporte com gelo. O tubo foi agitado e 1,0 mL (branco), foi transferido e adicionado a um tubo de centrífuga contendo 1,0 mL do reagente de Sumner. Os tubos foram agitados a cada 5 minutos. Amostras de 1,0 mL, após 30 e 60 min, foram coletadas procedendo de modo idêntico ao anteriormente citado. Todos os tubos foram centrifugados por 8 min a

4.200 rpm e os sobrenadantes transferidos para tubos de ensaio previamente rotulados, os quais permaneceram por 5 min em banho-maria de água fervente para desenvolver a cor, sendo resfriados em banho de água fria e acrescentando-se 10 mL de água destilada. Essa solução foi homogeneizada e a leitura da absorbância em λ de 540 nm foi determinada contra o branco (Rodrigues 1987). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mmol de glicose mL⁻¹ min⁻¹ nas condições do ensaio (U = $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos após o cultivo dos fungos em meio sintético contendo CMC como única fonte de carbono. Destaca-se que, inicialmente, a incubação das culturas a 50 °C apresentou duplo efeito na formação da zona de degradação da celulose. Primeiro, por permitir uma hidrólise mais rápida da celulose, assegurando que apenas as celulasas

Tabela 1. Atividade da celulase de fungos filamentosos isolados do solo da região do Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 4 dias a 28 °C. Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); Ie = índice enzimático; nc = não cresceu; (-) = não produziu halo.

Table 1. Cellulase activity of filamentous fungi isolated from soil of the Banhado Grande region, Ecological Station of Juréia-Itatins, SP, cultivated on synthetic medium with carboxymethylcellulose for 4 days at 28 °C. Øc = colony diameter (mm); Øh = halo diameter (mm); Ie = enzymatic index; nc = without growth; (-) = without halo production.

Fungos	Øc	Øh	Ie	Fungos	Øc	Øh	Ie
<i>Aspergillus niger</i>	29	42	1,4	<i>Penicillium janthinellum</i>	14	27	1,9
<i>Aspergillus wentii</i>	6	11	1,8	<i>Penicillium miczynskii</i>	1	5	5,0
<i>Aspergillus</i> sp.	1	-	-	<i>Penicillium nigricans</i> I	12	25	2,1
<i>Chalara paradoxa</i>	50	60	1,2	<i>Penicillium nigricans</i> II	11	21	1,9
<i>Chaunopycnis alba</i>	nc	-	-	<i>Penicillium nigricans</i> III	10	20	2,0
<i>Chloridium virescens</i> I	3	-	-	<i>Penicillium oxalicum</i>	4	16	4,0
<i>Chloridium virescens</i> II	1	-	-	<i>Penicillium purpurogenum</i> I	6	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	-	-	<i>Penicillium purpurogenum</i> II	8	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	nc	-	-	<i>Penicillium purpurogenum</i> III	5	-	-
<i>Cylindrocladium clavatum</i>	10	16	1,6	<i>Penicillium rugulosum</i>	5	-	-
<i>Doratomyces stemonitis</i>	nc	-	-	<i>Penicillium sclerotiorum</i> I	11	15	1,4
<i>Gliocephalotrichum simplex</i>	30	-	-	<i>Penicillium sclerotiorum</i> II	10	16	1,6
<i>Gliocladium nigrovirens</i>	nc	-	-	<i>Penicillium sclerotiorum</i> III	5	13	2,6
<i>Gliocladium roseum</i> I	nc	-	-	<i>Penicillium simplicissimum</i> I	8	21	2,6
<i>Gliocladium roseum</i> II	nc	-	-	<i>Penicillium simplicissimum</i> II	16	22	1,4
<i>Metarhizium anisopliae</i>	nc	-	-	<i>Penicillium simplicissimum</i> III	nc	-	-
<i>Mucor hiemalis</i>	80	-	-	<i>Penicillium simplicissimum</i> IV	18	22	1,2
<i>Myrothecium roridum</i> I	nc	-	-	<i>Penicillium simplicissimum</i> V	18	26	1,4
<i>Myrothecium roridum</i> II	6	10	1,7	<i>Penicillium spinulosum</i> I	6	10	1,7
<i>Myrothecium roridum</i> III	nc	-	-	<i>Penicillium spinulosum</i> II	2	3	1,5
<i>Paecilomyces carneus</i> I	nc	-	-	<i>Penicillium variabile</i> I	6	11	1,8
<i>Paecilomyces carneus</i> II	nc	-	-	<i>Penicillium variabile</i> II	6	11	1,8
<i>Paecilomyces carneus</i> III	3	-	-	<i>Penicillium verruculosum</i> I	12	18	1,5
<i>Penicillium aculeatum</i>	2	-	-	<i>Penicillium verruculosum</i> II	1	5	5,0
<i>Penicillium citrinum</i> I	10	28	2,8	<i>Penicillium</i> sp.	12	20	1,7
<i>Penicillium citrinum</i> II	12	20	1,7	<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	nc	-	-
<i>Penicillium corylophilum</i>	10	20	2,0	<i>Scopulariopsis carbonaria</i>	nc	-	-
<i>Penicillium decumbens</i>	20	-	-	<i>Trichoderma hamatum</i> I	2	12	6,0
<i>Penicillium fellutanum</i> I	20	-	-	<i>Trichoderma hamatum</i> II	1	2	2,0
<i>Penicillium fellutanum</i> II	nc	-	-	<i>Trichoderma harzianum</i> I	73	-	-
<i>Penicillium funiculosum</i>	7	-	-	<i>Trichoderma harzianum</i> II	67	72	1,1
<i>Penicillium glabrum</i> I	5	13	2,6	<i>Trichoderma harzianum</i> III	68	-	-
<i>Penicillium glabrum</i> II	3	15	5,0				
<i>Penicillium herquei</i>	2	12	6,0				

continua

continuação

Fungos	Øc	Øh	Íe	Fungos	Øc	Øh	Íe
<i>Trichoderma harzianum</i> IV	21	-	-	<i>Trichoderma koningii</i> III	51	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> V	90	-	-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	66	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> VI	6	24	4,0	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> I	62	-	-
<i>Trichoderma inhamatum</i> I	55	-	-	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> II	80	-	-
<i>Trichoderma inhamatum</i> II	64	-	-	<i>Trichoderma viride</i> I	68	-	-
<i>Trichoderma koningii</i> I	62	-	-	<i>Trichoderma viride</i> II	70	-	-
<i>Trichoderma koningii</i> II	90	-	-	<i>Verticillium lecanii</i>	3	9	3,0

termoestáveis fossem selecionadas. E segundo, por acarretar inibição no crescimento dos fungos ou morte dos mesmos (Montenecourt & Eveleigh 1977). Este último efeito foi constatado, pois os resultados demonstraram que não houve alterações nos valores entre os diâmetros das colônias medidos antes e após o choque térmico.

A zona mais clara ao redor das colônias, correspondente ao halo indicador da degradação da CMC, foi observada em 36 linhagens, ou seja, 45% dos fungos estudados. Procurando-se comparar essas linhagens, foi estabelecido um índice enzimático e por meio deste observou-se que algumas colônias com pouco crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos, como *Penicillium herquei* e *Trichoderma hamatum* I (diâmetro da colônia = 2 mm, índice = 6,0), *Penicillium miczynskii* e *Penicillium verrucosum* II (diâmetro da colônia = 1 mm, índice = 5,0) e *Penicillium glabrum* II (diâmetro da colônia = 3 mm, índice = 5,0).

Resultado semelhante foi observado em 48 linhagens de fungos isolados de aveia industrializada, que tiveram colônias de menor diâmetro e maiores valores de atividade da celulase (Nogueira & Cavalcanti 1996). Pode-se concluir que o valor do índice enzimático neste estudo não foi um parâmetro adequado de avaliação na tentativa de comparar atividades entre diferentes linhagens. Esse índice pode ser utilizado, entretanto, como uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido para selecionar mutantes, o que foi verificado com sucesso em linhagens de bactérias (Teather & Wood 1982).

O halo indicador da degradação da CMC não foi observado em 29 linhagens (\cong 36%), incluindo 14 linhagens do gênero *Trichoderma*, considerado como fonte de celulasas (Feldman *et al.* 1988, Galliano *et al.* 1988). A visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir

no corante proporcionando resultados falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (Neirotti & Azevedo 1988).

As outras 15 linhagens (\cong 19%) estudadas não cresceram nas condições deste experimento. Contudo, quando cultivadas em ágar carboximetilcelulose apresentaram crescimento e, dentre estas, 11 apresentaram halo ao redor das colônias (tabela 2). Esse resultado ressaltou a importância do controle dos fatores ambientais de crescimento, como a presença de

Tabela 2. Atividade da celulase de fungos filamentosos isolados da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, cultivados em ágar carboximetilcelulose por 4 dias a 28 °C. Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); Íe = índice enzimático; (-) = não produziu halo.

Table 2. Cellulase activity of filamentous fungi isolated from Ecological Station of Juréia-Itatins, SP, cultivated on carboxymethylcellulose agar medium for 4 days at 28 °C. Øc = colony diameter (mm); Øh = halo diameter (mm); Íe = enzymatic index; (-) = without halo production.

Fungos	Øc	Øh	Íe
<i>Chaunopycnis alba</i>	6	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp	24	33	1,4
<i>Doratomyces stemonitis</i>	7	12	1,7
<i>Gliocladium nigrovirens</i>	8	18	2,3
<i>Gliocladium roseum</i> I	26	40	1,5
<i>Gliocladium roseum</i> II	18	26	1,4
<i>Metarhizium anisopliae</i>	13	-	-
<i>Myrothecium roridum</i> I	14	-	-
<i>Myrothecium roridum</i> III	14	-	-
<i>Paecilomyces carneus</i> I	12	26	2,2
<i>Paecilomyces carneus</i> II	10	12	1,2
<i>Penicillium fellutanum</i> II	9	16	1,8
<i>Penicillium simplicissimum</i> III	8	17	2,1
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	36	52	1,4
<i>Scopulariopsis carbonaria</i>	9	10	1,1

aminoácidos e/ou fontes orgânicas de nitrogênio, além de outros. A utilização do ágar carboximetilcelulose contendo baixas concentrações de asparagina e extrato de leveduras foi fator importante para a produção da celulase nesses fungos.

Na tabela 3 são apresentados os resultados das atividades da celulase em papel de filtro (FPase) após 14 dias a 28 °C, e aqueles realizados em meio de farelo de trigo (CMCase) após 4 dias a 25 °C. Dos fungos estudados, 64 linhagens (80%) apresentaram atividade

Tabela 3. Atividade da celulase de fungos filamentosos isolados do solo da região do Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, cultivados em papel de filtro (FPase) por 14 dias a 28 °C e em farelo de trigo (CMCase) por 4 dias a 25 °C. U = unidade de atividade enzimática ($\mu\text{mols mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); U_f = unidades de FPase; U_c = unidades de CMCase.

Table 3. Cellulase activity of filamentous fungi isolated from soil of the Banhado Grande region, Ecological Station of Juréia-Itatins, SP, cultivated on filter paper (FPase) for 14 days at 28 °C and wheat bran medium (CMCase) for 4 days at 25 °C. U = enzymatic activity units ($\mu\text{mols mL}^{-1} \text{min}^{-1}$); U_f = FPase units; U_c = CMCase units.

Fungos	U_f	U_c	Fungos	U_f	U_c
<i>Aspergillus niger</i>	0,018	1,01	<i>Penicillium purpurogenum</i> I	0,015	0,71
<i>Aspergillus wentii</i>	-	0,55	<i>Penicillium purpurogenum</i> II	0,016	0,34
<i>Aspergillus</i> sp.	-	0,72	<i>Penicillium purpurogenum</i> III	-	1,09
<i>Chalara paradoxa</i>	0,015	1,03	<i>Penicillium rugulosum</i>	0,017	0,23
<i>Chaunopycnis alba</i>	-	-	<i>Penicillium sclerotiorum</i> I	0,017	0,47
<i>Chloridium virescens</i> I	0,018	0,36	<i>Penicillium sclerotiorum</i> II	0,015	0,75
<i>Chloridium virescens</i> II	-	0,50	<i>Penicillium sclerotiorum</i> III	0,016	0,51
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	0,47	<i>Penicillium simplicissimum</i> I	0,017	0,78
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	0,11	<i>Penicillium simplicissimum</i> II	0,014	0,47
<i>Cylindrocladium clavatum</i>	0,014	0,62	<i>Penicillium simplicissimum</i> III	-	0,39
<i>Doratomyces stemonitis</i>	-	0,27	<i>Penicillium simplicissimum</i> IV	0,019	0,74
<i>Gliocaplotrichum simplex</i>	0,018	0,02	<i>Penicillium simplicissimum</i> V	0,021	0,74
<i>Gliocladium nigrovirens</i>	0,015	0,38	<i>Penicillium spinulosum</i> I	0,014	0,69
<i>Gliocladium roseum</i> I	0,015	0,93	<i>Penicillium spinulosum</i> II	0,019	0,70
<i>Gliocladium roseum</i> II	0,015	0,10	<i>Penicillium variabile</i> I	0,015	0,74
<i>Metarhizium anisopliae</i>	-	0,59	<i>Penicillium variabile</i> II	0,015	0,12
<i>Mucor hiemalis</i>	0,014	0,53	<i>Penicillium verruculosum</i> I	0,016	0,49
<i>Myrothecium roridum</i> I	0,016	0,33	<i>Penicillium verruculosum</i> II	0,014	0,40
<i>Myrothecium roridum</i> II	-	0,51	<i>Penicillium</i> sp.	0,016	0,59
<i>Myrothecium roridum</i> III	-	-	<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	0,019	0,72
<i>Paecilomyces carneus</i> I	0,015	0,66	<i>Scopulariopsis carbonaria</i>	0,023	0,21
<i>Paecilomyces carneus</i> II	0,016	0,49	<i>Trichoderma hamatum</i> I	0,015	0,95
<i>Paecilomyces carneus</i> III	0,016	0,63	<i>Trichoderma hamatum</i> II	0,017	0,41
<i>Penicillium aculeatum</i>	0,015	0,18	<i>Trichoderma harzianum</i> I	0,016	0,67
<i>Penicillium citrinum</i> I	0,015	1,07	<i>Trichoderma harzianum</i> II	0,016	1,02
<i>Penicillium citrinum</i> II	0,021	0,66	<i>Trichoderma harzianum</i> III	-	1,42
<i>Penicillium corylophilum</i>	0,015	0,60	<i>Trichoderma harzianum</i> IV	0,014	0,40
<i>Penicillium decumbens</i>	0,021	0,18	<i>Trichoderma harzianum</i> V	0,015	1,64
<i>Penicillium fellutanum</i> I	0,017	1,00	<i>Trichoderma harzianum</i> VI	0,017	0,35
<i>Penicillium fellutanum</i> II	-	0,48	<i>Trichoderma inhamatum</i> I	0,019	1,32
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,016	0,57	<i>Trichoderma inhamatum</i> II	0,015	1,07
<i>Penicillium glabrum</i> I	0,015	0,56	<i>Trichoderma koningii</i> I	0,017	0,86
<i>Penicillium glabrum</i> II	0,016	0,59	<i>Trichoderma koningii</i> II	0,015	0,96
<i>Penicillium herquei</i>	0,016	0,81	<i>Trichoderma koningii</i> III	0,016	0,06
<i>Penicillium janthinellum</i>	0,017	0,93	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,018	1,42
<i>Penicillium miczynskii</i>	-	0,79	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> I	0,015	1,10
<i>Penicillium nigricans</i> I	-	0,49	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> II	0,014	1,45
<i>Penicillium nigricans</i> II	0,019	0,79	<i>Trichoderma viride</i> I	0,014	1,17
<i>Penicillium nigricans</i> III	0,020	0,71	<i>Trichoderma viride</i> II	0,017	0,83
<i>Penicillium oxalicum</i>	0,019	0,59	<i>Verticillium lecanii</i>	0,016	0,51

FPase que variou entre $1,4 \cdot 10^{-2}$ e $2,3 \cdot 10^{-2}$ U, sendo o melhor resultado obtido com *Scopulariopsis carbonaria*.

Resultados com valores superiores foram obtidos por Attili (1994) estudando fungos isolados do solo do Banhado Grande (EEJI) e processados com a mesma metodologia de análise descrita anteriormente. Neste estudo, *Aspergillus giganteus* apresentou maior valor para a atividade FPase, $7,6 \cdot 10^{-2}$ U. Em outro trabalho, Cenciani (1997) cultivou *Gliocladium nigrovirens* e *Gliocladium roseum* I e II, em diferentes meios de cultura e variou as condições de cultivo. Os resultados, porém, foram inferiores aos obtidos no presente estudo.

O cultivo de *Aspergillus terreus* GN1 em fermentador com capacidade de 10 L, em bagaço de cana-de-açúcar tratado com álcali, proporcionou uma atividade de FPase de $3,2 \cdot 10^{-2}$ U (Garg & Neelakantan 1982). Quatro linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* cultivadas em diferentes meios de cultura apresentaram resultados que variaram de 3,9 a 16,3 U (Cochet 1991). Todavia, melhor resultado ($18,0 \text{ U mL}^{-1}$) foi verificado com *Trichoderma* sp. A-001 em meio contendo papel de filtro e 0,2% do surfactante Tween 80 (Gashe 1992). Observa-se que a atividade da celulase depende, não somente da linhagem, mas das técnicas utilizadas.

Os fungos foram, finalmente, cultivados em meio de farelo de trigo por 4 dias a 25 °C, para verificar a atividade CMCase, que foi evidenciada em 78 linhagens (95%). As únicas exceções foram as linhagens de *Myrothecium roridum* III e *Chaunopycnis alba* que também não apresentaram atividade nos experimentos anteriores (tabelas 1, 3). Quatorze linhagens tiveram atividade igual ou superior a uma unidade de atividade CMCase $\text{mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ nas condições do ensaio, sendo *Trichoderma harzianum* V aquela que apresentou melhor resultado (1,64 U). Apesar de estudos demonstrarem o potencial das linhagens de *Trichoderma* na produção de celulases (Cochet 1991, Gashe 1992), e serem algumas espécies usadas intensivamente para a despoluição ambiental pela capacidade de degradarem resíduos e efluentes (Buchert *et al.* 1993), espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também têm sido citadas como boas produtoras destas enzimas (Kurasawa *et al.* 1992, Kuhad & Singh 1993, Castillo *et al.* 1994, Kim *et al.* 1997). O gênero *Penicillium*, representado por maior número de linhagens aqui estudadas, tem sido constantemente utilizado como fonte de enzimas em vários setores industriais (Carvalho *et al.* 1992, Teixeira 1994).

Os resultados deste estudo evidenciaram que a produção de celulases depende do tipo de substrato e que o uso de distintos métodos torna difícil a comparação com os resultados obtidos por diferentes autores. Deve-se salientar ainda que os fungos produtores de celulases, na natureza, não ocupam o mesmo nicho ecológico em cultura pura, onde não existe competição; ao contrário, eles interagem com outros organismos celulolíticos e com aqueles que degradam vários polímeros. Essa associação é responsável pela completa mineralização dos substratos celulósicos nos ecossistemas onde estes organismos estão inseridos. Além disso, as linhagens de fungos do solo aqui investigadas foram isoladas em duas áreas com coberturas vegetais distintas e em diferentes estações do ano. Acrescente-se que os meios de cultura e pHs utilizados para o isolamento também foram diferentes, na tentativa de ampliar a diversidade da micota resultante (Garlipp 1995). Todos esses fatores influenciaram diretamente os resultados obtidos com os diferentes isolados de uma mesma espécie, como por exemplo os apresentados por *Trichoderma harzianum* I a VI (tabelas 1, 3).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que, dentre as linhagens estudadas, não houve nenhuma que se destacasse das demais, quanto ao potencial para produção de atividade da celulase. Todas elas, praticamente, se igualaram. 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. Sugere-se, que estudos mais detalhados com as linhagens de *Trichoderma*: *T. harzianum* III e V, *T. inhamatum* I, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* II e *T. viride* I, deverão ser realizados, através de outros testes laboratoriais, para verificar melhor o potencial enzimático de tais linhagens.

Agradecimentos – Os autores agradecem à Fapesp pelo auxílio financeiro (Processo 96/7636-0) e pela bolsa de doutorado concedida a Ruegger (Processo 96/07574-5).

Referências bibliográficas

- ATTILI, D.S. 1994. Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

- BAYER, E.A. & LAMED, R. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.
- BUCHERT, J., SALMINEN, J., SIIKA-AHO, M., RANUA, M. & VIKARI, L. 1993. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to leaching. *Holzforschung* 47:473-478.
- CARVALHO, S.M.S., TEIXEIRA, M.F.S., ESPOSITO, E., MACHUCA, A., FERRAZ, A. & DÚRAN, N. 1992. Fungal screening from decayed Laurel and Cedar trees. *Applied Biochemical and Biotechnology* 37:150-157.
- CASTILLO, M.R., GUTIERREZ-CORREA, M., LINDEN, J.C. & TENDERDY, R.P. 1994. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 16:967-972.
- CENCIANI, K. 1997. Atividade enzimática de espécies do gênero *Gliocladium* isolado do solo da Estação Ecológica Juréia-Itatins, SP. Monografia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- COCHET, N. 1991. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. *Enzyme and Microbial Technology* 13:104-109.
- FELDMAN, K.A., LOVETT, J.S. & TSAO, G.T. 1988. Isolation of the cellulase enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. *Enzyme and Microbial Technology* 10:262-272.
- GALLIANO, H., GAS, G. & DURANT, H. 1988. Lignocellulose biodegradation and ligninase excretion by mutant strains of *Phanerochaete chrysosporium* hyperproducing cellulases. *Biotechnology Letters* 10:655-660.
- GARG, S.K. & NEELAKANTAN, S. 1982. Bioconversion of sugar cane bagasse for cellulase enzyme and microbial protein production. *Journal of Food Technology* 17:271-279.
- GARLIPP, A.B. 1995. Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- GASHE, B.A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. *Journal of Applied Bacteriology* 73:79-82.
- GRANDI, R.A.P. & ATTILI, D.S. 1996. Hyphomycetes on *Alchornea triplinervia* (Spreng.) Müll. Arg. leaf litter from the Ecological Reserve of Juréia-Itatins, State of São Paulo, Brazil. *Mycotaxon* 60:373-386.
- KIM, S.W., KANG, S.W. & LEE, J.S. 1997. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Bioresource Technology* 59:63-67.
- KUHAD, R.C. & SINGH, A. 1993. Enhanced production of cellulases by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9:100-101.
- KURASAWA, T., YACHI, M., SUTO, M., KAMAGATA, Y., TAKAO, S. & TOMITA, F. 1992. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:106-110.
- LYNCH, J.M., SLATER, J.H., BENNETT, J.A. & HARPER, S.H.T. 1981. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology* 127:231-236.
- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. 1977. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Applied and Environmental Microbiology* 33:178-183.
- NEIROTTI, E. & AZEVEDO, J.L. 1988. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. *Revista de Microbiologia* 19:78-81.
- NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia* 27:7-9.
- ORBERG, P.K. 1981. Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon.
- PINTO, I.M.A. 1999. As micotas filamentosas do solo e da água do Rio Una do Prelado, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- PRADA, G.M. & PAGNOCCA, F.C. 1997. Ascomycetous yeasts associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. *Folia Microbiologica* 42:39-46.
- ROBSON, L.M. & CHAMBLISS, G.H. 1989. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology* 11:626-644.
- RODRIGUES, E.C. 1987. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- TAUK-TORNISIELO, S.M., GIANNOTTI, A.M.D., RUEGGER, M.J.S. & MALAGUTTI, E.N. 2000. Aphyllophorales from the Atlantic rainforest of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Ecology* 4:99-105.
- TEATHER, 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* 43:777-780.
- TEIXEIRA, M.F.S. 1994. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- THIEMANN, J.E., XAVIER, M.S.S.P., COLEN, G. & GUIA, M.M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. In *Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo* (J.S. Furtado, coord.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185.