

Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas¹

DIANNY CAROLYNE VASCONCELOS DA SILVA^{2,3}, PATRICIA VIEIRA TIAGO²,
JORGE LUIZ SCHIRMER DE MATTOS³, LAURA MESQUITA PAIVA² e
CRISTINA MARIA DE SOUZA-MOTTA^{2,4}

(recebido: 31 de maio de 2011; aceito: 07 de dezembro de 2011)

ABSTRACT – (Isolation and screening of filamentous fungi from soil of agroforestry systems in the municipality of Bom Jardim (PE) for the ability to produce hydrolytic enzymes). This study aimed to isolate and identify fungi from soil of agroforestry systems and to evaluate the enzymatic activity of these fungi. These were isolated by successive dilution technique and evaluated for their ability to degrade starch, cellulose and caseine. Eleven species of anamorph fungi (Hyphomycetes) distributed in five genera were identified: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* and *Penicillium*. The species studied did not show satisfactory amyolytic activity. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries and *Penicillium chrysogenum* Thom had higher enzyme relation index (ERI) for protease and cellulase. Among the species studied six showed higher Relative Enzymatic Index (IRE) for cellulase in comparison to the other enzymes.

Key words - amylase, cellulase, protease

RESUMO – (Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas). O presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar fungos de solo de sistemas agroflorestais e avaliar a atividade enzimática destes fungos. Estes foram isolados pela técnica de diluição sucessiva e avaliados quanto à capacidade de degradar amido, celulose e caseína. Foram identificadas 11 espécies de fungos anamorfos (Hyphomycetes) distribuídos em cinco gêneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium*. As espécies estudadas não apresentaram atividade amilolítica satisfatória. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries e *Penicillium chrysogenum* Thom apresentaram maior índice de relação enzimática (IRE) para protease e celulase. Entre as espécies estudadas seis apresentaram maior Índice de Relação Enzimática (IRE) para celulase em comparação as demais enzimas.

Palavras-chave - amilase, celulase, protease

Introdução

Os Sistemas Agroflorestais (SAFs) são sistemas de uso da terra nos quais espécies perenes lenhosas (árvores, arbustos, palmeiras e bambus) são intencionalmente utilizadas e manejadas em associação com cultivos agrícolas e/ou animais. Determinado consórcio pode ser chamado de agroflorestal na condição de ter pelo menos uma espécie tipicamente florestal, nativa ou

aclimatada, de porte arborescente ou arbustivo (May & Trovatto 2008).

O solo é um recurso natural essencial para o funcionamento do ecossistema terrestre e representa um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Os microrganismos são um dos principais seres vivos encontrados e a sua atividade afeta diretamente os fatores químicos e físicos do solo, contribuindo para sua produtividade (Pereira *et al.* 2007). O conhecimento da micota 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 que poderão ser importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (Ruegger & Tauk-Tornisielo 2004). O presente trabalho teve por objetivo isolar e identificar fungos de solo de sistema agroflorestal no município de Bom Jardim, PE e avaliar a produção enzimática destes fungos.

1. Parte da monografia de Graduação da primeira autora, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.
2. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Avenida Professor Nelson Chaves s/n, 50676-420 Recife, PE, Brasil.
3. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Educação, Avenida Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.
4. Autor para correspondência: dy_carol@hotmail.com

Material e métodos

Coleta do solo – A coleta das amostras de solo foi realizada em 08/10/2007 em três propriedades familiares, com aproximadamente 0,5 ha, localizadas na comunidade Feijão I, no Município de Bom Jardim, PE, 07°47'45,0" de latitude sul e 35°35'14,0" de longitude oeste. Os SAFs, tipo agrofloresta, apresentam predominantemente fruteiras tropicais e arbóreas nativas da Mata Atlântica. As amostras de solo foram coletadas até 20 cm de profundidade, em três pontos aleatórios por propriedade, constituindo uma amostra composta.

Isolamento dos fungos – Para obtenção das colônias fúngicas foi realizada a técnica de suspensão seriada de acordo com Clark (1965) modificado, em que 25 g de amostra de solo foram homogeneizadas em 225 mL de água destilada esterilizada. As diluições (10^{-2} e 10^{-3}) foram plaqueadas em ágar Sabouraud, acrescido de cloranfenicol (100 mg L^{-1}) (Lacaz *et al.* 1991) e as placas foram incubadas a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, durante cinco dias. As colônias fúngicas distintas (características macroscópicas) foram purificadas através da técnica de esgotamento por estrias (Ribeiro & Soares 2002) em ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (100 mg L^{-1}) e incubadas a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante três dias. Após a purificação, as amostras foram transferidas para meios específicos (ágar Czapeck, batata dextrose ágar-BDA, ágar malte) contidos em tubos de ensaio ($18 \times 180 \text{ mm}$) para identificação, observando as características macroscópicas (textura, coloração e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas), com base na literatura especializada. Um representante de cada espécie foi depositado na Coleção de Culturas Micoteca URM, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Índice enzimático dos fungos – Pequenas porções da cultura fúngica com sete dias de crescimento em ágar Czapeck (*Aspergillus* e *Penicillium*) e BDA (demais gêneros) foram transferidas com fio de platina para o centro da placa de Petri contendo o meio de cultura específico para cada enzima. Para a avaliação da capacidade de produzir amilase, foi utilizado o meio ágar Czapeck (Lacaz *et al.* 2002), modificado com adição de amido ($0,01 \text{ g mL}^{-1}$). Para a celulase foi utilizado o meio descrito por Neirotti & Azevedo (1988) sem adição de extrato de malte e para protease o meio de caseína (Lacaz *et al.* 1991). As culturas foram incubadas a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por cinco dias. Após esse período, para a visualização do halo de degradação do amido e da caseína foi utilizado álcool iodado e a solução acidificada de cloreto de mercúrio, respectivamente. Para visualização do halo de degradação pela celulase foi utilizado o método de acordo com Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004). Para obtenção dos índices enzimáticos, foi utilizado o Índice de Relação Enzimática ($\text{IRE} = \text{D/d}$), em que D equivale ao diâmetro total (halo + colônia) e d equivale ao diâmetro da colônia, ambos medidos com régua (Tiago & Silva 2007).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 11×3 , sendo onze espécies de fungos isolados e três meios de cultura,

com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa Assistat 7.5 beta (Silva & Azevedo 2009).

Resultados e discussão

Foram isoladas 11 espécies de fungos anamorfos (Hyphomycetes) distribuídos em cinco gêneros: *Aspergillus* (4 spp.), *Cladosporium* (1 sp.), *Curvularia* (1 sp.), *Fusarium* (2 sp.) e *Penicillium* (3 spp.) (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados por Cavalcanti *et al.* (2006), no solo de caatinga na região Xingó, por Souza-Motta *et al.* (2003), na rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.). Schoenlein *et al.* (2008) observaram a prevalência dos gêneros *Aspergillus*, mas também *Trichoderma* em amostras de solo da região dos lagos no município de Santa Gertrudes, SP.

Observou-se que *Fusarium lateritium* e *Fusarium oxysporum* não apresentaram capacidade de degradar o amido (tabela 1). Para as demais espécies, foi observado halo de degradação correspondente ao tamanho da colônia ($\text{IRE} = 1$). Link & Onofre (2010) verificaram, em meio sólido, a atividade amilolítica de fungos do gênero *Penicillium* e *Fusarium* isolados de ramos de vassourinha (*Baccharis dracunculifolia* DC.). Outras espécies de fungos apresentaram capacidade de degradar o amido, como Mucorales isolados de solo de mineração de cobre (Santiago & Souza-Motta 2006), *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* e *Aspergillus phoenicis* de amostras de solo de diferentes regiões do Estado de São Paulo (Guimarães *et al.* 2006), enquanto Silva *et al.* (2006) observaram ausência de atividade amilolítica para os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, fungos endofíticos de *Annona* spp.

Cladosporium cladosporioides ($\text{IRE} = 1,95$) e *Penicillium chrysogenum* ($\text{IRE} = 1,94$) se destacaram quanto à capacidade de degradar celulose, seguidos por *Penicillium decumbens*. Degradação de celulose também foi observada para as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de resíduos de mamona (*Ricinus communis*) (Herculano *et al.* 2011). Vinte espécies de *Penicillium*, isoladas de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins – SP, foram avaliadas por Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) quanto à produção de celulase e, entre estas espécies, *P. decumbens* não apresentou atividade celulolítica.

Cladosporium cladosporioides e *P. chrysogenum* apresentaram maior capacidade de degradar caseína. Atividade proteolítica já foi observada para os gêneros

Tabela 1. Índice de Relação Enzimática (IRE) de fungos filamentosos isolados de solo de sistemas agroflorestais, no Município de Bom Jardim – PE.

Table 1. Enzyme Relation Index (IRE) of filamentous fungi isolated from soil agroforestry systems, in Bom Jardim – PE.

Nº de Registro URM	Espécies	IRE		
		Amilase	Celulase	Protease
URM5841	<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	1.00 aA	1.00 eA	1.00 cA
URM5855	<i>A. flavus</i> Link	1.00 aB	1.35 cA	1.00 cB
URM5853	<i>A. niger</i> van Thieghem	1.00 aB	1.32 cA	0.00 dC
URM5851	<i>A. niveus</i> Blochwitz	1.00 aB	1.39 cA	1.00 cB
URM5843	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) De Vries	1.00 aC	1.95 aA	1.33 aB
URM5856	<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	1.00 aA	1.00 eA	1.00 cA
URM5844	<i>Fusarium lateritium</i> Nees	0.00 bB	1.07 deA	1.02 bcA
URM5845	<i>Foxysporum</i> Schelecht	0.00 bB	1.18 dA	1.14 bA
URM5892	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	1.00 aC	1.94 aA	1.31 aB
URM5897	<i>P. decumbens</i> Thom	1.00 aB	1.64 bA	0.00 dC
URM5916	<i>P. janthinelum</i> Biourge	1.00 aA	1.00 eA	1.00 cA

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúscula (vertical) e maiúscula (horizontal), não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Means followed by the same letter, lower case (vertical) and capital (horizontal) do not differ by Tukey test at 5% probability.

Fusarium e *Penicillium*, fungos isolados de frutos do café (*Coffea arabica* L.) por Rodarte *et al.* (2011). Santiago & Souza-Motta 2008, obtiveram resultados semelhantes com Mucorales isolados de milho processado (*Zea mays*).

Não houve diferença na degradação de amido, caseína e celulose por *Aspergillus clavatus*, *Curvularia pallescens* e *Penicillium janthinelum*. *Fusarium lateritium* e *F. oxysporum* apresentaram os maiores índices enzimáticos para celulase e protease em comparação à amilase, a qual não foi produzida por estes fungos. No entanto, *A. flavus*, *A. niger*, *A. niveus*, *C. cladosporioides*, *P. chrysogenum* e *P. decumbens* apresentaram maiores índices enzimáticos para celulase em comparação às demais enzimas. Segundo Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), os fungos que decompõem substâncias celulósicas geralmente ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes.

Os fungos isolados de solo de sistemas agroflorestais apresentaram os maiores índices enzimáticos para celulase e, entre estes, as espécies que se destacaram foram *C. cladosporioides* e *P. chrysogenum*, sendo indicadas para estudos de produção em meio líquido.

Referências

- CAVALCANTI, M.A.Q., OLIVEIRA, L.G., FERNANDES, M.J. & LIMA, D.M. 2006. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 20:831-837.
- CLARK, F.E. 1965. Agar-plate method for total microbial count. *In* Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. (C.A. Blanc, D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger, F.E. Clark & R.C. Dinauer, eds.). Madson Inc., New York, p.1460-1466.
- GUIMARÃES, L.H.S., PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C., MICHELIN, M., RIZZATTI, A.C.S., SANDRIM, V.C., ZANOELO, F.F., AQUINO, A.C.M.M., BARBOSA JUNIOR, A. & POLIZELI, M.L.T.M. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:474-480.
- HERCULANO, P.N., LIMA, D.M.M., FERNANDES, M.J.S., NEVES, R.P., SOUZA-MOTTA, C.M. & PORTO, A.L.F. 2011. Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). *Current Microbiology* 62:1416-1422.
- LACAZ, C.S., PORTO, E. & MARTINS, J.E.C. 1991. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. Savier, São Paulo.
- LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C.M., HEIS-VACCARI, E.M. & MELO, N.T. 2002. *Tratado de micologia médica*. 9ª ed, Sarvier, São Paulo.
- LINK, S. & ONOFRE, S.B. 2010. Microrganismos epifíticos da vassourinha – *Baccharis dracunculifolia* D. C. (*Asteraceae*). *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente* 3:131-143.
- MAY, P.H. & TROVATTO, C.M.M. 2008. *Manual agroflorestal para a Mata Atlântica*. Ministério do Desenvolvimento Agrário, Brasília.
- NEIROTTI, E. & AZEVEDO, J.L. 1988. Técnica semiquantitativa de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. *Revista de Microbiologia* 19:78-81.

- PEREIRA, A.A., HUNGRIA, M., FRANCHINI, J.C., KASCHUK, G., CHUEIRE, L.M.O., CAMPO, R.J. & TORRES, E. 2007. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 31:1397-1412.
- RIBEIRO, M.C. & SOARES, M.M.S.R. 2002. *Microbiologia prática: roteiro e manual*. Atheneu, São Paulo.
- RODARTE, M.P, DIAS, D.R., VILELA, D.M. & SCHWAN, R.F. 2011. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy* 33: 457-464.
- RUEGGER, M.J.S. & TAU-K-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* 27:205-211.
- SANTIAGO, A.L.C.M.A. & SOUZA-MOTTA, C.M. 2006. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. *Acta Botanica Brasílica* 20:641-647.
- SANTIAGO, A.L.C.M.A. & SOUZA-MOTTA, C.M. 2008. Isolation of Mucorales from processed maize (*Zea mays* L.) and screening for protease activity. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:698-700.
- SCHOENLEIN, N.C., CORSO, C.R., SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H., SOUZA, J.I. & OLIVEIRA, L.H.S. 2008. Fungos anamorfo do solo da região dos lagos no Município de Santa Gertrudes, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 31:667-678.
- SILVA, F.A.S. & AZEVEDO, C.A.V. 2009. Principal components analysis in the software Assistat – Statistical Assistance. *In* World Congress on Computers in Agriculture. 7th ed, American Society of Agricultural and Biological Engineers, Reno.
- SILVA, R.L.O., LUZ, J.S., SILVEIRA, E.B. & CAVALCANTE, U.M.T. 2006. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botanica Brasílica* 20:649-655.
- SOUZA-MOTTA, C.M., CAVALCANTI, M.A.Q., FERNANDES, M.J.S., LIMA, D.M.M., NASCIMENTO, J.P. & LARANJEIRA, D. 2003. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:273-280.
- TIAGO, P.V. & SILVA, R.J. 2007. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. *Ciência Rural* 37:26-30.