

Revista Agrária Acadêmica

[Agrarian Academic Journal](#)

Volume 2 – Número 5 – Set/Out (2019)



doi: 10.32406/v2n52019/41-54/agrariacad

Biodegradação da madeira de eucalipto por fungos de podridão. Biodegradation of eucalyptus wood by wood-rotting fungi

Blenda Naara Santos da Silva¹, Maria Alves Ferreira², Nonato Junior Ribeiro dos Santos¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, 69080-900. Manaus - AM, Brazil. blenda.naara@gmail.com

² Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Pc. Edemir Sá Santos S/N, CEP: 37200-000, Lavras (MG), Brasil

Resumo

Fungos xilófagos são utilizados para diversos fins biotecnológicos, como destoca biológica, sacarificação de biomassa e produção de etanol, estudos de resistência da madeira e de seus subprodutos. Dessa maneira, o presente trabalho, objetivou selecionar fungos com maior capacidade de degradação de madeira de eucalipto, a fim de contribuir para pesquisas futuras, no âmbito da biodegradação e biotecnologia. Foram utilizados 39 fungos apodrecedores, 35 foram identificados através da região ITS, cinco não produziram fenoloxidasas e todos os xilófagos causaram perda de massa nos cavacos de madeira após 120 dias. Oito fungos não diferiram estatisticamente do controle positivo, indicando que tais microrganismos possuem boa capacidade deteriorativa dos compostos da madeira.

Palavras-chave: Perda de massa, microrganismos, xilófagos, fenoloxidase.

Abstract

Xylophagous fungi are used for various biotechnological purposes, such as biological discoloration, saccharification of biomass and ethanol production, resistance studies of wood and its by-products. In this way, the present work aimed to select fungi with greater capacity for degradation of eucalyptus wood, in order to contribute to future research, in the scope of biodegradation and biotechnology. 39 rotting fungi were used, 35 were identified through the ITS region, five did not produce phenoloxidasas and all xylophages caused mass loss in the wood chips after 120 days. Eight fungi did not differ statistically from the positive control, indicating that these microorganisms have good deteriorating capacity of the wood compounds.

Keywords: Mass loss, microorganisms, xylophages, phenoloxidase

Introdução

A madeira é um material orgânico, complexo e heterogêneo, suscetível à deterioração biológica (bactérias, fungos, insetos e xilófagos marinhos), física e química. Os fungos são, provavelmente, uma das causas mais comuns de degradação da madeira. Os fatores fundamentais para ocorrência de fungos na madeira são temperatura, umidade e baixos teores de extrativos totais presentes no substrato (KRISHNA; MOHAN, 2017). No entanto a capacidade de deterioração dos componentes da madeira varia de acordo com o hospedeiro e a espécie fúngica. Além disso, a variabilidade está relacionada ao complexo enzimático presente em cada espécie ou linhagem fúngica (MACHUCA; FERRAZ, 2001). Durante o processo de biodegradação, a presença de polímeros naturais presentes nas células da madeira, serve como fonte de nutrição, metabolizada pelos microrganismos, em unidades digeríveis por meio da ação de sistemas enzimáticos (OLIVEIRA; TOMASELLO; SILVA, 2005). Na degradação dos constituintes estruturais da madeira ocorrem fungos que são classificados de acordo com o tipo de decomposição que causam: podridão branca e parda (principalmente por basidiomicetos) e podridão mole (ascomicetos) (PALA, 2007).

Os fungos de podridão branca atuam na superfície da parede celular vegetal e são capazes de degradar seus três principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) (KRISHNA; MOHAN, 2017). Dentre os grupos enzimáticos produzidos por fungos de podridão branca estão a lacase e a fenoxidase extracelular com importante papel na degradação da lignina (UPADHYAY et al., 2016; SENTHIVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2016). Os fungos de podridão parda degradam a superfície da parede celular, especialmente as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) por ação enzimática e não-enzimática, gerando um resíduo enriquecido em lignina (KRISHNA; MOHAN, 2017). Os fungos de podridão mole ou branda amolecem a superfície da madeira, devido à degradação da hemicelulose e celulose. Podem ainda degradar a lignina, porém em velocidades muito reduzidas (MADADI et al., 2017).

O eucalipto é uma das principais fontes de matéria-prima para fabricação de papel e celulose, com enorme importância nesse mercado. As árvores plantadas de eucalipto e pinus são responsáveis por mais de 98% do volume produzido de celulose e o Brasil ocupa primeiro lugar no ranking produtor mundial de celulose de eucalipto. Ambos os setores são extremamente importantes, e em 2018, o setor de papel e celulose tiveram participação significativa do setor na Balança Comercial Brasileira, movimentando 54.666 e 42.423 US\$ Milhões FOB no mercado exportações e importações (IBÁ, 2019). Entretanto para a produção de produção de papel e celulose, os cavacos de madeira são submetidos a uma série de processos mecânicos, como a retirada de fibras, e químicos para retirada da lignina, e outros constituintes menos abundantes (IBÁ, 2019). Outros processos empregados são o branqueamento, a destintagem, o tratamento das águas residuais, etc (PALA, 2007). Desse modo, estudos voltados para uso de fontes mais sustentáveis têm sido realizados com o objetivo de diminuir os altos custos, tempo de produção e baixo retorno, principalmente se tratando de processos químicos (PÉREZ 2002; SUGANO 2019; CHAKRABORTY, 2019).

Nesse âmbito, os fungos xilófagos podem ser uma alternativa, pois são capazes de decompor materiais lignocelulósicos, característica usada pela primeira vez no setor papelero e extremamente útil para diversos fins biotecnológicos. Como a destoca biológica, que utiliza fungos apodrecedores em tocos e raízes remanescentes após a colheita florestal, tais organismos aceleram a decomposição desses tocos em plantios de *Eucalyptus* sp. e possibilitam a diminuição dos custos com destoca mecânica e agressividade ao meio ambiente (ALONSO; SILVA; KASUYA, 2007). A partir de fungos de podridão pode-se produzir coquetéis enzimáticos para sacarificação de biomassa, possibilitando a

quebra de componentes lignocelulósicos de difícil rompimento, tornando a biomassa mais acessível a outros tratamentos, e dessa forma auxilia na produção de etanol e branqueamento de polpa celulósica (FALKOSKI et al., 2013). Fungos xilófagos também podem ser utilizados no tratamento de efluentes e descontaminação ambiental, pois evitam o acúmulo de resíduos com baixos níveis de degradação, e desse modo tem-se a diminuição dos custos com reagentes químicos e o uso de compostos tóxicos comumente utilizados nesses processos (SOUZA; ROSADO, 2009).

Além do uso no setor papelheiro, a aplicação de fungos apodrecedores auxilia a de definir novas táticas de controle e preservação da deterioração na madeira, e de identificar um potencial de aplicação tecnológica alargado. Indiretamente o estudo com microrganismos norteia a pesquisa na área da engenharia genética, com a finalidade principal de aumentar a resistência das espécies arbóreas à decomposição biológica e, conseqüentemente, do produto final madeireiro (PALA, 2007; CHAKRABORTY 2019). Considerando a ampla utilização de fungos decompositores e a necessidade de estudos focados na agressividade de xilófagos, o presente trabalho teve como objetivo selecionar fungos com maior capacidade de degradação de madeira de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*), a fim de contribuir para pesquisas futuras, no âmbito da biotecnologia madeireira.

Material e métodos

Coleta e isolamento de fungos

Foram coletados 38 fungos associados à madeira e tocos em decomposição, nos fragmentos florestais do campus da Universidade Federal de Lavras, Universidade Federal de Viçosa e nas imediações das cidades de Lavras e Silveirânia – MG.

Os fungos foram isolados a partir da retirada de fragmentos das estruturas fúngicas de basidiomas ou ascocarpos. Os fragmentos foram desinfestados superficialmente em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito 2% por 2 minutos, e submersos em água esterilizada duas vezes para eliminar o excesso de hipoclorito. Após a desinfestação superficial, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo Batata Dextrose Ágar (BDA Himedia®) e incubados a 26 °C/7 dias para crescimento das colônias. O armazenamento dos isolados foi realizado em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, tubos de *eppendorfs* contendo NaCl, pelo método de castellani, mantidos em temperatura ambiente e em tubos de *eppendorfs* com glicerina 15% conservados a -80 °C.

Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi realizada por meio da observação das estruturas macro- e micromorfológicas dos fungos logo após a coleta, e observação das colônias fúngicas crescidas em meio BDA 25 °C/7 dias.

Caracterização molecular dos isolados fúngicos

Extração de DNA

A extração do DNA, foi realizada a partir da transferência de cinco discos de micélio de 7 mm para frascos contendo 200 mL de meio líquido (20 g de extrato de malte/ 1 L de água) mantido à temperatura de 28 °C por 15 dias. A massa micelial produzida após esse período foi filtrada, seca e mantida a -80 °C até o momento da extração.

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Patologia Florestal da UFV, utilizando Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA) com modificações no protocolo de acordo com Valdetaro (2012).

Inicialmente transferiu-se o micélio para um tubo *ependorff* de 2 mL, contendo 200 µL de solução de lise dos núcleos e bolinha de chumbo, levado ao aparelho “Tissuelyser III” (Quiagen®) a 30 HZ por dois minutos. O macerado obtido foi incubado a -20 °C por cinco min a fim de ajudar na lise celular. Posteriormente, repetiu-se o processo anterior, porém acrescentou-se 400 µL de solução de lise dos núcleos, macerou-se no “Tissuelyser III” a 30 HZ por dois min, e incubou-se a 65 °C por 15 min, invertendo os tubos a cada cinco os. Em centrífuga (Eppendorf Microcentrifuge 5415R) as amostras permaneceram por cinco min a 13 000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo *ependorff* de 1,5 mL e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, adicionou-se 300 µL de solução de precipitação de proteína. Os tubos foram invertidos cuidadosamente, e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 500 µL de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1) agitando-se cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante cinco min e transferidas (fase superior) para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol gelado e incubadas “overnight” a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* remanescente, adicionou-se 600 µL de etanol gelado, agitou-se o tubo cuidadosamente e centrifugou-se a 13.000 rpm por cinco minutos. Essa etapa foi repetida três vezes a fim de se obter DNA livre de impurezas. Após remover o etanol, os tubos foram deixados em posição horizontal com tampa aberta sobre papel toalha por 15 min para secagem do *pellet*. O DNA foi ressuscitado em 30 µL de solução de reidratação de DNA acrescido de 1 µL de solução de RNase e incubado a 65 °C por 10 min e, posteriormente 37 °C por cinco horas. O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para 10 ng µL⁻¹ utilizando-se o aparelho Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Amplificação e purificação dos produtos da PCR

A amplificação e purificação do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Patologia Florestal da UFV de acordo com o protocolo dos *kits* utilizados. Para amplificação utilizou-se *kit* Thermo Scientific Dream Taq PCR Master Mix® (2X). Os iniciadores utilizados foram os oligonucleotídeos ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990) para estudo da região ITS (Internal Transcribed Spacer). A região foi amplificada usando termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®), com a seguinte reação 12,5 µL de Dream Taq PCR Master Mix 2x (0,4 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, e 4Mm de MgCl₂), 1,5 µL de cada *primer* diluído (1:10), 2 µL de DNA e 7,5 µL de água ultrapura para completar o volume final da reação de 25 µL.

A reação de PCR foi obtida nas seguintes condições: temperatura de desnaturação de 96 °C por cinco min, seguido de 35 ciclos 94 °C por 30s, 50 °C por 30s, e 72 °C por 90s e extensão final de 72 °C por quatro minutos.

Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a 80 V durante 60 min, contrastados em brometo de etídio 1%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pelo uso do padrão de peso molecular de 1 Kb Plus Ladder (Invirogen®). Os géis foram fotografados pelo aparelho de fotodocumentação Loccus Biotecnologia Molecular Imaging Transilluminator. Os produtos da PCR foram purificados usando o Kit GFX™ PCR DNA® and Gel

Band Purification® de acordo com o protocolo do fabricante e armazenados a -20 °C até o momento do sequenciamento.

Edição e alinhamento das sequências

Os fragmentos de DNA foram sequenciados nas direções senso e antissenso no Laboratório de Genômica da Universidade Federal de Viçosa por eletroforese capilar em sequenciador automático MEGA BACE®. A edição dos eletroferogramas gerados foi realizada com o auxílio do programa SeqAssem versão 2007/2008. Sequências de referência correspondentes à região genômica do ITS foram comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) pela ferramenta BLAST que mostra a porcentagem de similaridade dos isolados estudados em relação às sequências já depositadas no Genbank.

Determinação da capacidade de produção de fenoloxidase

A capacidade dos isolados de causar podridão em madeira foi determinada pelo teste de Bavendamm (DAVIDSON; CAMPBELL; BAISDELL, 1938), que permite observar a produção de oxidase celular como lacase, tirosinase e catecol oxidase (BURKE; CAIRNEY, 2002; SHLEEV et al., 2004). Para isso, foram retirados das bordas de colônias com 8 - 10 dias de idade, discos de micélio com 7 mm de diâmetro, transferidos para placas de Petri contendo meio extrato de malte (15 g/L), ágar (20 g/L) e ácido tânico (5 g/L). As colônias foram avaliadas com 24, 48 horas e cinco dias após a incubação. Realizou-se a avaliação visual e quando houve formação de halo marrom, foi considerado como reação positiva para produção de fenoloxidases. A análise qualitativa da produção de enzima foi realizada de acordo com Davidson, Campbell e Baisdell (1938). A cultura de *Pycnoporus sanguineus* (PS) foi empregada como controle positivo do teste de Bavendamm.

Determinação da capacidade dos isolados fúngicos em causar a perda de massa em cavacos de eucalipto

O teste de perda de massa foi conduzido nos Laboratórios de Nematologia e de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A madeira em cavacos do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* foi cedida pela empresa FIBRIA S.A. O ensaio de degradação acelerada foi feito de acordo as normas adaptadas da ASTM (2017) (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM, 2005).

Inicialmente amostras de cavacos foram separadas para obtenção da massa seca inicial. Posteriormente os cavacos foram imersos em água e, após 24h, o excesso foi drenado. Amostras foram retiradas para determinação da densidade básica da madeira (SMITH, 1954). Em frascos de vidro foram colocados 85,37 g de solo sem matéria orgânica, com umidade previamente ajustada para 130% (ASTM, 2007), em seguida, 10 g ± 1 de cavacos saturados foram acondicionados junto ao solo (Figura 1a). Os frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 kgf/cm³ durante 40 minutos. Após 24h, cinco discos de micélio de 7 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias cultivadas em BDA por 8 - 10 dias a 25 °C, foram transferidos assepticamente para o substrato contido no interior dos frascos. Posteriormente, os frascos foram fechados com auxílio de liga de borracha, 2 tecidos de 12 x 12 cm com poro de 30 µm cada, e papel alumínio. Os frascos foram armazenados a 24 °C ± 2 em umidificador de ar, no escuro, por 120 dias (Figura 1b e 1c).

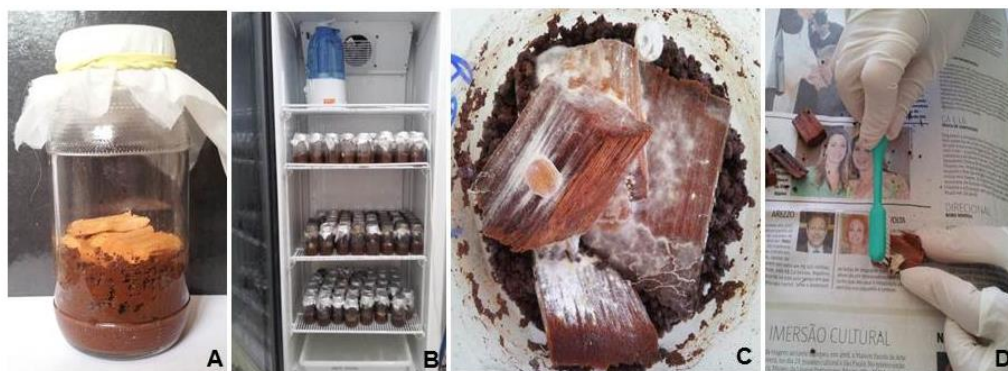


Figura 1. Teste ensaio de degradação acelerada. (A) Acondicionamento dos cavacos sob o solo, (B) Armazenamento dos recipientes por 120 dias, (C) Crescimento fúngico nos cavacos de eucalipto e (D) Limpeza dos cavacos para avaliação da perda de massa.

Para avaliação do experimento, a massa micelial aderida aos cavacos foi retirada com o auxílio de escova de cerdas duras (Figura 1d). Após a limpeza, os cavacos foram acondicionados em sacos de papel devidamente identificados e colocados em estufa a 102 ± 2 °C até obter massa constante para determinação da massa seca.

Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e quatro repetições. A madeira não tratada com o fungo foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o fungo *P. sanguineus* (PS). Para análise dos dados foi utilizado o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias calculadas pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$). A perda de massa foi calculada em relação à testemunha, deste modo, garantiu-se que as perdas de massa causadas pelos fungos nos cavacos de madeira, foram resultantes exclusivamente do ataque fúngico (ALONSO; SILVA; KASUYA, 2007).

Resultados e discussão

Identificação molecular e morfológica dos isolados fúngicos

A identificação em nível de espécie foi possível para aqueles isolados fúngicos cujos caracteres morfológicos observados na coleta e nas colônias fúngicas crescidas em BDA corresponderam à identificação molecular realizada a partir da região ITS do DNA ribossomal (Tabela 2). Os isolados PD19, PD25, PD57 e PD67 não foram identificados devido à baixa similaridade com as sequências depositadas no GenBank e sobreposição das sequências inviabilizando a identificação correta dos isolados.

Tabela 1. Origem, identificação molecular e similaridade dos isolados fúngicos com sequências depositadas no GenBank (região ITS).

Código	Origem	Substrato	Gênero e/ou espécie	Similaridade (%) ¹
PD1	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	99
PD2	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Lentinus crinitus</i>	99
PD13	Lavras, MG	*	<i>Schizophyllum commune</i>	91
PD14	Lavras, MG	*	<i>Phanerochaete</i> <i>chysosporium</i>	98

PD16	Silveirânia, MG	*	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99
PD17	Silveirânia, MG	*	<i>Schizophyllum commune</i>	98
PD19	Lavras, MG	*	*	-
PD20	Lavras, MG	*	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99
PD21	Lavras, MG	*	<i>Schizophyllum commune</i>	99
PD25	Lavras, MG	*	*	-
PD28	Lavras, MG	*	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100
PD29	Lavras, MG	*	<i>Schizophyllum commune</i>	99
PD30	Lavras, MG	*	<i>Xylaria curta</i>	99
PD35	Lavras, MG	*	<i>Scytalidium</i> sp.	91
PD44	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	90
PD45	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	90
PD46	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	98
PD47	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelanicum</i>	<i>Xylaria</i> sp.	90
PD48	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelanicum</i>	<i>Xylaria</i> sp.	99
PD50	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelanicum</i>	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	98
PD51	Lavras, MG	<i>Astronium fraxifolium</i>	<i>Ganoderma subamboinense</i>	99
PD52	Lavras, MG	*	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	98
PD56	Lavras, MG	*	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100
PD57	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelanicum</i>	*	-
PD58	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelanicum</i>	<i>Ganoderma subamboinense</i>	99
PD59	Lavras, MG	*	<i>Arthrimum</i> sp.	98
PD60	Lavras, MG	<i>Caesalpinia ferrea</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>	97
PD63	Lavras, MG	*	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	96
PD65	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Stereum hirsutum</i>	95
PD66	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Lentinus bertieri</i>	94
PD67	Lavras, MG	<i>Eucalyptus</i> sp.	*	-
PD68	Lavras, MG	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Trametes elegans</i>	99
PD69	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma parvulum</i>	97
PD70	Lavras, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	97
PD71	Lavras, MG	<i>Cinnamom zelanicum</i>	<i>Perenniporia martia</i>	100

PD72	Viçosa, MG	<i>Cinnamomum zelanicum</i>	<i>Perenniporia martia</i>	98
PD74	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Ganoderma</i> sp.	97
PD75	Viçosa, MG	<i>Delonix regia</i>	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	100
PD76		<i>Delonix regia</i>	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	99

¹ Porcentagem de similaridade com os isolados depositados no Genbank[®].

* Não foi possível fazer a identificação em nível de gênero ou espécie (similaridade <90%).

Produção de fenoloxidasas

Foram testados 38 isolados fúngicos quanto à produção de fenoloxidase (Tabela 3) e considerados positivos quando houve difusão de halo ao redor do crescimento micelial, variando de coloração marrom claro ao marrom escuro (Figura 2). A difusão da zona marrom pela colônia fúngica é resultado da oxidação do ácido tânico, decorrente da presença de fenoloxidase, no aparato enzimático do fungo. A oxidação desse substrato é mediada por pelo menos três fenoloxidasas, incluindo catecol oxidase, lacase e tirosinase, no entanto não indica especificamente qual atividade enzimática está envolvida (BURKE; CAIRNEY, 2002). A reação de Bavendamm para basidiomicetos, em geral mostra a produção de lacase e tirosinase (SHLEEV et al., 2004).

A lignina pode ser degradada por várias enzimas, contudo dentro do grupo fenoloxidase, a presença de lacase no aparato enzimático do fungo, revela uma característica essencial para degradação de madeira (BLANCHETTE, 1998).

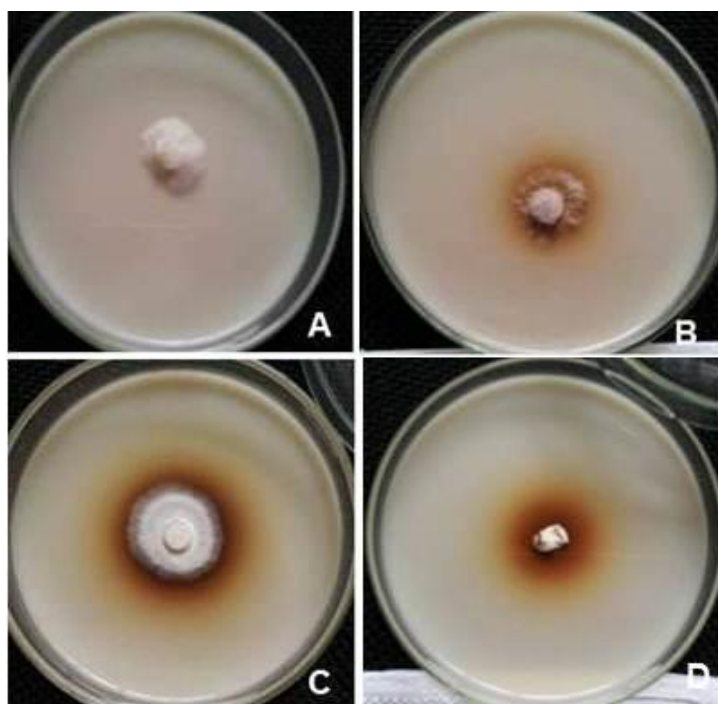


Figura 2. Expressão da atividade enzimática dos fungos PD30 (A), PD35 (B), PD44 (C) e PD46 (D) cultivados em meio malte acrescido de 5% de ácido tânico. O isolado PD30 não produziu de fenoloxidase.

Tabela 2. Análise qualitativa e quantitativa de produção enzimática por fungos ascomicetos e basidiomicetos isolados em Silveirânia, Lavras e Viçosa – MG.

Cód. do isolado	Gênero/Espécie	Fenoloxidase
PD1	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	+++
PD2	<i>Lentinus crinitus</i>	+++
PD13	<i>Schizophyllum commune</i>	++
PD14	<i>Phanerochaete chysosporium</i>	-
PD16	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD17	<i>Schizophyllum commune</i>	++
PD20	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	++
PD21	<i>Schizophyllum commune</i>	+++
PD25	*	+++
PD28	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD29	<i>Schizophyllum commune</i>	++
PD30	<i>Xylaria curta</i>	-
PD35	<i>Scytalidium</i> sp.	+++
PD44	<i>Ganoderma</i> sp.	+++++
PD45	<i>Ganoderma</i> sp.	+++++
PD46	<i>Ganoderma</i> sp.	+++++
PD47	<i>Xylaria</i> sp.	+++
PD48	<i>Xylaria</i> sp.	+++
PD50	<i>Gymnopilus lepidotus</i>	-
PD51	<i>Ganoderma subamboinense</i>	++++
PD52	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD56	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+++
PD58	<i>Ganoderma subamboinense</i>	+++++
PD59	<i>Arthrimum</i> sp.	-
PD60	<i>Ganoderma parvulum</i>	++++
PD63	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	-
PD65	<i>Stereum hirsutum</i>	+++
PD66	<i>Lentinus bertieri</i>	++
PD67	*	++
PD68	<i>Trametes elegans</i>	+
PD69	<i>Ganoderma parvulum</i>	++++
PD70	<i>Ganoderma</i> sp.	+++
PD71	<i>Perenniporia martia</i>	++
PD72	<i>Perenniporia martia</i>	+++
PD74	<i>Ganoderma</i> sp.	++++
PD75	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	++
PD76	<i>Rigidoporus ulmarius</i>	++
PS	<i>P. sanguineus</i>	++++

Intensidade visual da produção de enzima: - não produziu ... +++++ maior produção.

Cerca de 90% dos isolados fúngicos após 1-2 dias foram capazes de produzir fenoloxidase. Na maior parte das reações, houve coloração máxima após 24h, exceto o isolado fúngico PD17 na qual a presença de halo foi observada somente após cinco dias.

A diferença de dias para início da produção de fenoloxidase pelos isolados PD17, PD13, PD21 e PD29, identificados como *Schizophyllum commune*, assim como oxidase observada com coloração mais escura pelo PD21, possivelmente se deve à variabilidade genética intraespecífica dos fungos. Os isolados PD13, PD17, PD29, PD20 e PD57 não produziram halo ao redor da colônia fúngica, porém apresentaram reação de oxidase abaixo da colônia com coloração marrom escuro. Os isolados PD2, PD35, PD65, PD66, PD75 e PD76 demonstraram produção média de fenoloxidase.

Os isolados PD46, PD58 e PD68 produziram atividade enzimática, no entanto, não houve crescimento fúngico no meio de cultura, apresentando halo marrom escuro a marrom claro. Isso ocorre, provavelmente, devido ao efeito tóxico do ácido agindo na hifa fúngica e inibindo seu crescimento micelial (DAVIDSON; CAMPBELL; BAISDELL, 1938).

Os melhores resultados foram observados para as espécies de *Ganoderma* spp. (PD44, PD45, PD46 e PD58) e *Perenniporia martia* (PD71 e PD72) que, visualmente, apresentaram maior produção de fenoloxidase com presença de halo marrom escuro ao redor e abaixo das colônias. Kumari e Sirsi (1972) observou que culturas de *G. lucidum* são capazes de oxidar componentes típicos da atividade de lacase, também estudado por Manavalan et al. (2013) que verificou a produção de lacase em quantidade significativamente maior por *G. lucidum* em relação à *Pycnoporus cinnabarinus*. Pointing et al. (2005) constataram que a espécie *Perenniporia medula-panis* possui o gene específico de lacase, atividade enzimática já evidenciada na literatura por Machuca e Ferraz (2001).

Não houve oxidação do ácido tânico por cinco fungos testados, sendo eles PD14 (*P. chrysosporium*), PD30 (*Xylaria* sp.), PD50 (*Gymnopilus lepidotus*), PD59 (*Arthrimum* sp.) e PD63 (*Gloeophyllum abietinum*). O isolado PD14 não apresentou crescimento no meio com ácido tânico nem halo de oxidação. Isso ocorre porque a espécie *P. chrysosporium*, muito estudada por sua capacidade de degradar todos os componentes da madeira, não produz fenoloxidase para decompor a lignina, e conta apenas com as lignases: manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiPs) (DASHTBAN et al., 2010). Dentro do gênero *Gymnopilus* as espécies têm sido reportadas como fungos de podridão branca e marrom, apesar de nem todos terem habilidade de degradar lignina, todas as espécies desse grupo são ótimos degradadores de celulose (FAUSTO-GUERRERA; GUZMÁN-DÁVALOS; VELÁZQUEZ-HUESO, 2002).

Os fungos ascomicetos em sua maioria são capazes de degradar celulose e hemicelulose, porém a habilidade de degradar lignina é limitada (MARTINEZ et al., 2005), contudo Pointing et al. (2005) relataram que os ascomicetos *Xylaria* sp. e *Hypoxyllum* sp. possuem o gene específico da lacase, assim como os basidiomicetos. Entre os ascomicetos estudados a atividade fenolítica foi constatada em todas as espécies, exceto em *Xylaria* sp. e *Arthrimum* sp.

Capacidade dos isolados fúngicos causarem perda de massa

Foram feitas 128 observações no teste de degradação acelerada (Figura 3), e todos os fungos apodrecedores testados no presente estudo foram capazes de causar algum grau de degradação nos cavacos de eucalipto. O híbrido *E. urograndis* x *E. urophylla* possui densidade básica de 0,620 g/cm³, similar ao mesmo híbrido avaliado por Santos e Sansígolo (2007) com 0,680 g/cm³ classificado com elevada densidade. Os autores observaram presença de 30% de lignina, 4% de extrativos e 67% de holocelulose. A densidade é um dado importante na correlação com a perda de massa, pois madeiras de alta densidade apresentam teores maiores de extrativos, lignina, e componentes químicos que retardam o crescimento fúngico no substrato de madeira, diferente das madeiras de baixa densidade.

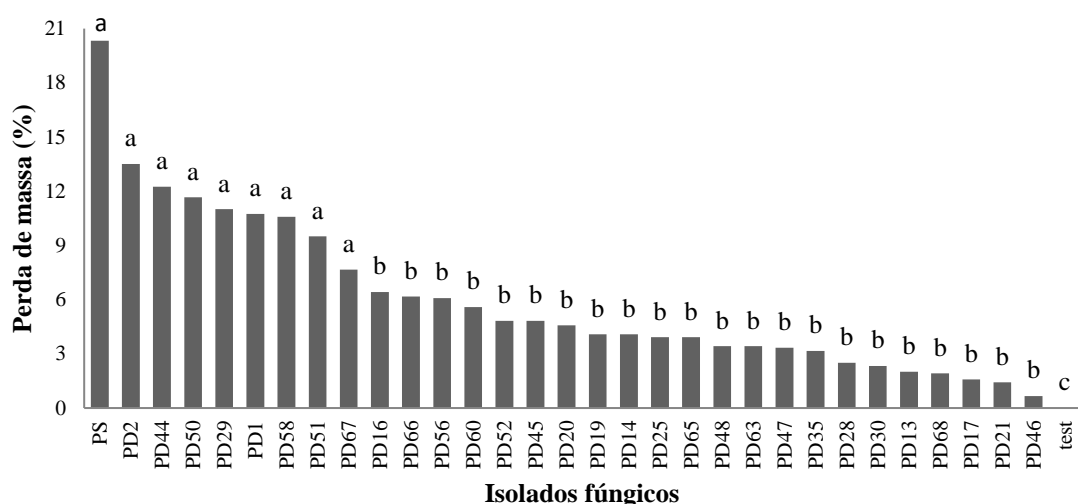


Figura 3. Perda de massa em porcentagem causada pelos isolados fúngicos. Teste Scott-Knott ao nível de 5%, CV= 3,74%. Valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente.

Os fungos xilófagos diferiram quanto à capacidade de degradar os cavacos de madeira, porém 27% (8) dos isolados foram estatisticamente similares ao controle positivo *Pycnoporus sanguineus*, indicando que os fungos do presente estudo possuem capacidade similar ao controle utilizado. O *P. sanguineus* é um fungo de podridão branca com excelente eficiência na deslignificação da lignina solúvel e seus extrativos (RIBES et al., 2018) tornando-o um ótimo agente biotecnológico para fins voltados ao biopolpação e biobranqueamento de papel e celulose, e biodegradação de xenobióticos, organopoluentes e contaminantes industriais (LOMASCOLO et al., 2011).

As maiores perdas de massa foram constatadas pelos isolados *P. sanguineus* (PS e PD1) com perdas de 20,5% e 10,8%, *Lentinus crinitus* (PD2) com 13,5%, *S. commune* (PD29) com 11%, *Ganoderma* sp. (PD44) com 12,3%, *G. lepidotus* (PD50) com 12% e *G. subamboinense* (PD58 e PD51) com 11% e 9,5%, respectivamente. Oliveira, Tomasello e Silva (2005) ao testar a degradação causada por *G. trabeum* em madeira de *Eucalyptus* sp. durante 120 dias observaram valores entre 0,5 e 4,6% para *E. grandis* e *E. citriodora*, respectivamente. Melhores resultados foram obtidos por Kunieda de Alonso et al. (2007) que após corrigir a relação C/N a fim de obter condições ideais para biodegradação dos cavacos testados, obtiveram perdas de massa de 25,6% (*Perenniophora* sp), 23,9%, 16,8% e 14,4% (*P. sanguineus*), 23,8% (*Pestalotiopsis* sp), 21,9% (*Ganoderma* sp.) e 12,5% (*T. versicolor*).

A diferença de perda de massa entre os isolados possivelmente se deve ao complexo enzimático inerente a cada fungo, uma vez que a capacidade de degradação biológica dos componentes da madeira varia entre isolados fúngicos de mesma espécie (MACHUCA; FERRAZ, 2001). Diferença também observada em isolados *P. sanguineus* com perdas de massa variando em 23,9%, 16,8% e 14,4% foram observadas por Kunieda de Alonso et al. (2007). Nesse estudo, os basidiomicetos *S. commune* também apresentaram diferença de perda de massa de 11%, 2%, 2% e 1,5% observada entre os isolados fúngicos PD29, PD13, PD17 e PD21, respectivamente.

Abreu et al. (2007) verificaram que em disco de madeira de *Eucalyptus* sp., *S. commune* promoveu perda de massa de 9,1%, valor similar ao encontrado neste trabalho com o isolado PD26 (11%), também similar ao fungo *S. commune* coletado na Indonésia, testado em *E. pellita*, considerada como madeira resistente, com perda de 11,3% (SUPRAPTI et al., 2010). Apesar de serem cepas

isoladas em diferentes regiões, o ataque a madeira depende também da estirpe fúngica (PILDAIN; NOVAS; CARMARÁN, 2005).

Os cavacos de madeira testados nesse estudo com *L. crinitus* (13,5%) e *L. bertieri* (6,16%) apresentaram perdas de massa com diferença significativa entre si, assim como observados por Negrão et al. (2014) que obteve perdas de 29,1% e 10,6% respectivamente em *L. bertieri* e *L. edodes* testadas durante 120 dias no híbrido *urograndis* com umidade do solo ajustada para 100%.

Os isolados de *Ganoderma* (PD44, PD51 e PD58) observados com maiores valores variaram entre 12,2% e 9,5%. Morais e Costa (2007), ao avaliarem a alteração de cor aparente das madeiras de *E. camaldulensis* e *E. pillularis* após tratamento com o fungo *G. applanatum*, relataram que a perda de massa foi avaliada em 6,6% e 4,7%, respectivamente.

A perda de massa e a oxidação do ácido tânico, demonstraram correlação direta. Uma vez que, os isolados que apresentaram, visualmente, maior atividade de fenoloxidase, PD44 e PD58, estavam grupo de xilófagos que não diferiram do controle positivo (grupo A). Entretanto a correlação não ocorreu entre todos os fungos. O isolado PD50, foi negativo no teste de Bavendamm, e apresentou valores altos de perda em relação aos outros isolados dentro do grupo A (PD29, PD1, PD58 e PD51) indicando que essa espécie utiliza outras enzimas na degradação da madeira. Shleev et al. (2004) verificaram que o Teste de Bavendamm não demonstrou ligação direta positiva com a dinâmica de oxidase, durante o cultivo submerso de basidiomicetes. Os autores verificaram que as cepas com maior atividade de oxidase mostraram menores níveis na reação de Bavendamm.

A diferença entre perda de massa e reação de Bavendamm observada nesse estudo possivelmente se deve à presença de outras enzimas agindo na degradação da madeira e do próprio substrato. O crescimento e fermentação do fungo em meio sólido é diferente daquele que ocorre em substratos líquidos ou a base de ágar, e conseqüentemente a produção de enzimas também é distinta (MACHUCA; FERRAZ, 2001).

Conclusões

Os xilófagos abordados nesse estudo são potentes biodegradadores da madeira de elevada resistência *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* especialmente as espécies *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus crinitus*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma* sp, *Gymnopilus lepidotus* e *Ganoderma subamboinense*. Tais resultados demosntram que esses fungos poderam futuramente ser empregados na degradação de madeiras altamente resistentes sem a necessidade do emprego de elevadas quantidade de reagentes químicos, contribuindo para a conservação do meio ambiente e diminuição de gastos.

Referências bibliográficas

- ABREU, L. D. et al. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 321-328, 2007.
- ALONSO, S. K.; SILVA, A. G.; KASUYA, M. C. M. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 145-155, 2007.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D1413-07: standard test method for wood preservatives by laboratory soil-block cultures. **ASTM Standards**, v. 4.10, n. 1, p. 1-8, 2007.

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D2017-05: standard test method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods. **ASTM Standards**, v. 7.6, n. 1, p. 1-8, 2005.
- BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archeological wood from different environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 46, n. 3, p. 184-204, 1998.
- BURKE, R. M.; CAIRNEY, J. W. G. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 12, n. 3, p. 105-116, 2002.
- CHAKRABORTY, D. et al. Integration of biological pre-treatment methods for increased resource recovery from paper and pulp biosludge. **Journal of microbiological methods**, v. 160, p. 93-100, 2019.
- DASHTBAN, M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.
- DAVIDSON, W. R.; CAMPBELL, W. A.; BAISDELL, D. J. Differentiations of wood-decaying fungus by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, v. 59, p. 683-695, 1938.
- FALKOSKI, D. L. et al. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, n. 1, p. 296-305, 2013.
- FAUSTO-GUERRA, S.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; VELÁZQUEZ-HUESO, J. C. Cultural studies of *Gymnopilus* species (Cortinariaceae, Agaricales). **Mycotaxon**, v. 84, n. 1, p. 429-444, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- IBÁ. Instituto Brasileiro de Árvores. **Relatório 2017**. Disponível na Internet https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Acesso em: 13 de junho de 2019.
- KRISHNA, M. P.; MOHAN, M. Litter decomposition in forest ecosystems: a review. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, n. 4, p. 236-249, 2017.
- KUMARI, H. L.; SIRSI, M. Purification and properties of Laccase from *Ganoderma lucidum*. **Archives in Mikrobiology**, v. 84, p. 350-357, 1972.
- KUNIEDA DE ALONSO, Sandra et al. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, 2007
- LOMASCOLO, A. et al. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1129-1149, 2011.
- MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6/7, p. 386-391, 2001.
- MADADI, M. et al. Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 8, n. 398, p. 2, 2017.
- MANAVALAN, T. et al. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, n. 1, p. 106-114, 2013.
- MARTINEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 194-204, 2005.
- MORAIS, F. M.; COSTA, A. F. Alteração da cor aparente de madeiras submetidas ao ataque de fungos apodrecedores. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p. 44-50, 2007.
- NEGRÃO, D. R. et al. Biodegradation of *Eucalyptus urograndis* wood by fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, n. 1, p. 95-102, 2014.
- OLIVEIRA, J. T.; TOMASELLO, M.; SILVA, J. C. Resistência natural da madeira de sete espécies de *Eucalipto* ao apodrecimento. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 993-998, 2005.

- PALA, H. Constituição e mecanismos de degradação biológica de um material orgânico: a madeira. **Construção Magazine**, p. 54-62, 2007.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.
- PILDAIN, M. B.; NOVAS, M. V.; CARMARÁN, C. C. Evaluation of anamorphic state, wood decay and production of lignin-modifying enzymes for diatrypaceous fungi from Argentina. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 1, n. 1, p. 81-96, 2005.
- POINTING, S. B. et al. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. **Mycological Research**, v. 109, n. 1, p. 115-124, 2005.
- RIBES, D. D. et al. *Pycnoporus sanguineus* fungus as wood biopulping. **Matéria**, v. 23, n. 4, 2018.
- SANTOS, S. R.; SANSÍGOLO, C. A. Influência da densidade básica da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na qualidade da polpa branqueada. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 1, p. 53-63, 2007.
- SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19-38, 2016.
- SHLEEV, S. V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, n. 9/10, p. 693-703, 2004.
- SMITH, D. M. Maximum moisture content method for determining specific gravity of small wood samples. **Agriculture**, n. 2014, p. 1-8, 1954.
- SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 121-139, 2009.
- SUGANO, J. et al. Cellulolytic activity of brown-rot *Antrodia sinuosa* at the initial stage of cellulose degradation. **Holzforschung**, 2019.
- SUPRAPTI, S. Decay resistance of 84 Indonesian wood species against fungi. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 22, n. 1, p. 81-87, 2010.
- UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 15, 2016.
- VALDETARO, D. C. O. F. **Morfologia, variabilidade e patogenicidade *Ceratocystis fimbriata* em *Hevea brasiliensis***. 2012. 28 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

Recebido em 28 de junho de 2019

Aceito em 10 de agosto de 2019