ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS
LIGNOCELULOLÍTICOS

VÂNIA APARECIDA VICENTE
Bióloga

Orientador: Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de "Mestre" em Agronomia. ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO: Microbiologia
Agrícola

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO-BRASIL
OUTUBRO DE 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

V632i Vicente, Vânia Aparecida
 Isolamento e seleção de fungos lignocelulolíti-
cos. Piracicaba, 1989.
 173p. ilustr.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Celulose - Biodegradação 2. Fungo lignocelulo-
lítico - Bioquímica 3. Fungo lignocelulolítico - Iso-
lamento 4. Fungo lignocelulolítico - Seleção 5. Lig-
nina - Biodegradação I. Escola Superior de Agricultu-
ra Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS
LIGNOCELULOTÍPICOS

VÂNIA APARECIDA VICENTE

Aprovada em: 14/11/1989

Comissão Julgadora:

Prof^a Dr^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sergio Olavo Pinto da Costa

IB/USP

Aline P. Pizzirani-Kleiner
Prof^a Dr^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner
Orientadora

Ao Prof. Dr. *Cyrol Grossi*
pela amizade e orientação

- minhas saudades -

Aos meus pais e irmãos
por tudo o que representam
na minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner, por sua amizade, orientação e confiança que muito contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, pelas sugestões, incentivo e amizade.

À Profa. Marilda C. Vidotto pela iniciação na área de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio O.P. Costa pela grande amizade e incentivo durante o curso.

Aos colegas do laboratório de Genética de Microrganismos, pela amizade e colaboração, e em particular aos amigos Edson N. Roumas, Maria H. P. Fungaro, Cláudia B. Monteiro, Márcia C. Furlaneto e M. Bernadete D. Aguilar, pelas inúmeras sugestões e apoio constantes.

Aos funcionários Antonio R. Campos, Carlos A. Nolasco e Sandra E.R.C. Wehr pelos serviços prestados, amizade e apoio constantes.

Aos Professores, Funcionários e Amigos do Departamento de Genética e de Tecnologia Rural pela agradável convivência.

A pesquisadora Maria J. Valarini pela ajuda inicial no trabalho de isolamento, a Profa. Dra. Luzia D. Paccola pela contribuição valiosa nas análises eletroforéticas e a Profa. Eleonora C. Rodrigues pelo companheirismo e ajuda prestada nas dosagens enzimáticas.

Aos amigos José S. Cunha Fernandes e Antonio Augusto F. Garcia pela valiosa contribuição na confecção das análises estatísticas.

A Bibliotecária Beatriz H. Giongo pelo eficiente auxílio na revisão da listagem bibliográfica.

A amiga Mônica R. Bertão pelas sugestões e ajuda na correção do manuscrito.

Ao pesquisador Itamar S. Mello pela amizade e estímulos constantes e ao Prof. Cláudio Costa pela versão do "Summary".

A Elisa S. Peron pelo eficiente trabalho datilográfico, ao Sr. Milton Capreci pelas fotografias e ao Engenheiro José C.R. Macedo pelas figuras.

A Guilherme de C. Andrade pelo companheirismo, carinho e apoio constante durante a elaboração deste trabalho.

As amigas Adriana C. Longo, Adelaide F. Marsiglio e Lucilene Ap. Anatrielo pelo convívio, carinho e apoio inestimáveis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da Bolsa de Estudos.

À Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, sub programa Biotecnologia/Energia do programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PADCT, pelos recursos financeiros da pesquisa.

A todos os parentes e amigos não citados que sempre deram estímulo e força para prosseguir.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xvi
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Celulose	5
2.1.1. Fontes naturais e estrutura química	5
2.1.2. Degradação microbiana da celulose	7
2.2. Lignina	17
2.2.1. Fontes naturais e estrutura química	17
2.2.2. Degradação de lignina por microrganismos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Microrganismos utilizados	27
3.1.1. Isolados	27
3.1.2. <i>Trichoderma reesei</i> QM9414	27
3.1.3. <i>Phanerochaeta chrysosporium</i> BKM-1767	27
3.2. Esterilização e incubação	28
3.3. Meios de cultura e soluções utilizados	28
3.3.1. Meio Mínimo	28
3.3.2. Meio completo	29
3.3.3. Meio completo líquido	29
3.3.4. Meio Batata-Glicose-Agar (BDA)	29

3.3.5. Meio de Enriquecimento e Isolamento para microrganismos celulolíticos	29
3.3.6. Meio Mineral para microrganismos celulolíticos - M.M.C.	30
3.3.7. Meio ágar celulose ácida - M.C.A.	30
3.3.8. Meio farelo de Trigo	31
3.3.9. Meio para atividade lignolítica - M.L.A.	32
3.3.10. Solução elemento traço	33
3.3.11. Solução de Vitaminas	33
3.3.12. Solução Salina	34
3.3.13. Solução "Tween 80"	34
3.3.14. Solução Giemsa	34
3.3.15. Solução de desoxicolato de sódio	34
3.3.16. Solução de salicina	35
3.3.17. Solução C	35
3.3.18. Reagente ácido dinitrosalicílico (DNS)	35
3.3.19. Reativo de Folin - Ciocalteau	35
3.3.20. Estoque de Acrilamida	36
3.3.21. Tampão do gel separador pH 8,9	36
3.3.22. Tampão do gel Empilhador pH 6,8	36
3.3.23. Tampão do Tanque	36
3.3.24. Tampão da amostra	37
3.3.25. Gel separador a 10%	37
3.3.26. Gel empilhador 4%	37
3.3.27. Fixador PAGE	38

3.3.28. Corante-esterase	38
3.3.29. Tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0	38
3.3.30. Tampão Fosfato pH 7,0	38
3.4. Isolamento dos fungos	39
3.5. Nomenclatura e manutenção das linhagens	39
3.6. Avaliações das condições de cultivo	40
3.7. Seleção em placa	40
3.8. Caracterização das linhagens	41
3.8.1. Obtenção de isolados monospórico	41
3.8.2. Classificação das linhagens	41
3.8.3. Técnica citológica	41
3.8.4. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo	42
3.8.5. Avaliação do melhor pH para o crescimento e esporulação em meio mineral e meio completo	42
3.8.6. Avaliação da influência do pH na produção de halo	43
3.8.7. Caracterização para padrões de esterase	44
3.9. Determinação da atividade celulase	46
3.9.1. Cultivo em meio semi-sólido	46
3.9.2. Ensaios enzimáticos	46
3.10. Avaliação da atividade ligninolítica	51
3.10.1. Obtenção do substrato lignina a partir de bagaço de cana-de-açúcar	51
3.10.2. Inóculo e cultivo	51

	Página
3.10.3. Quantificação da degradação da lignina	52
3.11. Observações de etapas da conidiogênese da linhagem	52
3.12. Sobrevivência à luz ultra-violeta	53
3.12.1. Isolamento de mutantes morfológicos	54
3.13. Análises estatísticas	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Isolamento dos fungos	55
4.2. Determinações das condições de cultivo	57
4.3. Seleção em placas	58
4.4. Caracterização das linhagens selecionadas	66
4.4.1. Obtenção de isolados monospóricos	66
4.4.2. Classificação das linhagens	68
4.4.3. Caracterização citológica das linhagens	68
4.4.4. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo	72
4.4.5. Crescimento e esporulação em diferentes valo- res de pH	73
4.4.6. Avaliação do melhor pH para produção de halo em meio contendo celulose ácida	92
4.4.7. Caracterização eletroforética das linhagens	98
4.5. Determinação da atividade celulase	101
4.5.1. Cultivo em meio semi-sólido	101
4.5.2. Dosagem bioquímica	102
4.6. Determinação da atividade ligninolítica	106
4.7. Caracterização genética-citológica da linhagem de <i>Fusarium solani</i> selecionada	109

4.7.1. Observação de algumas etapas da conidiogênese da linhagem <i>Fusarium solani</i>	110
4.7.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta	115
5. CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
APÊNDICE	152

LISTA DE TABELAS

Tabela nº		Página
1	Análise de variância da produção de halo dos isolados obtidos na coleta nº 1	60
2	Teste Tukey para médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção I)	61
3	Análise de variância da produção de halo dos isolados obtidos na coleta nº 2	62
4	Teste Tukey para as médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção II)	62
5	Análise de variância da produção de halos dos isolados obtidos na coleta nº 3	63
6	Teste Tukey para médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção III)	64
7	Análise de variância da produção de halo dos isolados na coleta nº 4	65
8	Teste Tukey para médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção IV)	65
9	Classificação das linhagens selecionadas produtoras de celulasas	67
10	Frequência de núcleos por conídios das linhagens estudadas	69

Tabela nº

Página

11	Avaliação do crescimento das linhagens celulolíticas nos diferentes meios de cultivo, utilizando o diâmetro médio de três repetições (em mm)	72
12	Crescimento de linhagens obtidas na seleção I, nos diferentes pH em meio completo (os dados constituem a média de três repetições)	74
13	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio completo, referente as linhagens obtidas na Seleção I	74
14	Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem	75
15	Avaliação do melhor pH para esporulação em meio completo (Seleção I)	75
16	Crescimento nos diferentes pH em meio mineral utilizando o diâmetro médio de três repetições (em mm) Seleção I	76
17	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção I	76
18	Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral dos diferentes pH para cada linhagem	77
19	Avaliação do melhor pH para esporulação em meio mineral contendo celulose cristalina como fonte de carbono (Seleção I)	77

20	Crescimento de linhagens obtidas na seleção II nos diferentes pH em meio completo. (Os dados constituem a média de três repetições em mm)	79
21	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio completo, referente às linhagens obtidas na Seleção II	79
22	Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem (Seleção II) .	80
23	Avaliação do melhor pH para esporulação em meio completo (Seleção II)	80
24	Crescimento de linhagens obtidas na seleção II nos diferentes pH em meio mineral (Os dados constituem a média de três repetições em mm)	81
25	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção II.....	81
26	Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral nos diferentes pH para cada linhagem (Seleção II)	82
27	Avaliação do melhor pH para a esporulação em meio mineral (Seleção II)	82
28	Crescimento de linhagens obtidas na seleção III nos diferentes pH em meio completo (Os dados constituem a média de três repetições em mm)	84

29	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio completo, referente as linhagens obtidas na Seleção III.....	84
30	Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem (Seleção III)	85
31	Avaliação do melhor pH para esporulação em meio completo (Seleção III)	85
32	Crescimento de linhagens obtidas na seleção III nos diferentes pH em meio mineral (Os dados constituem a média de três repetições em mm)	86
33	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção III	86
34	Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral nos diferentes pH para cada linhagem (Seleção III) ..	87
35	Avaliação do melhor pH para esporulação em meio mineral (Seleção III)	87
36	Crescimento de linhagens obtidas na seleção IV nos diferentes pH em meio completo (Os dados constituem a média de três repetições em mm)	88
37	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referentes as linhagens obtidas na Seleção IV	88

38	Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem (Seleção IV)	89
39	Avaliação do melhor pH para a esporulação em meio completo (Seleção IV)	89
40	Crescimento de linhagens obtidas na seleção IV nos diferentes pH em meio mineral (Os dados constituem a média de três repetições em mm)	90
41	Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção IV	90
42	Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral nos diferentes pH para cada linhagem (Seleção IV) ...	91
43	Avaliação da esporulação em meio mineral em diferentes pH (Seleção IV)	91
44	Análise de variância da produção de halos das linhagens, obtidas na seleção I, em diferentes pH	93
45	Teste Tukey para médias de área de degradação de celulose para cada linhagem nos diferentes pH (Seleção I)..	93
46	Análise de variância da produção de halo das linhagens, obtidas na seleção II, em diferentes pH	94
47	Teste Tukey para médias de área de degradação de celulose para cada linhagem (Seleção II)	94

Tabela nº

Página

48	Análise de variância da produção de halo das linhagens obtidas na seleção III, em diferentes pH	95
49	Teste Tukey para médias de área de degradação para cada linhagem (Seleção III)	95
50	Análise de variância da produção de halos das linhagens obtidas na seleção IV, em diferentes pH	96
51	Teste Tukey para médias de áreas de degradação para cada linhagem (Seleção IV)	96
52	Análise de variância da comparação das atividades celulases das linhagens selecionadas e <i>T. reesei</i> QM9414	104
53	Valores médios e significâncias das diferentes atividades enzimáticas relativas à linhagens obtidas na seleção I, II, III, IV	105
54	Atividade ligninolítica dos isolados, comparada com a linhagem <i>Phanerochaeta chrysosporium</i> (Os dados apresentados constituem a média de duas repetições)	107
55	Porcentagem de conídios de <i>Fusarium solani</i> sobreviventes à luz ultra-violeta (Os dados constituem média de três repetições)	117
56	Mutantes morfológicos resultantes do tratamento de conídios da linhagem <i>Fusarium solani</i> , com luz ultra-violeta, em diferentes tempos de tratamentos (total de três experimentos)	118

LISTA DE FIGURAS

Figura nº		Página
1	Fórmula estrutural da lignina	18
2	Álcoois precursores de lignina e nomenclatura dos carbonos	18
3	Retas padrões utilizadas para a determinação das atividades enzimáticas	50
4	Visualização do halo de degradação em celulose ácida	58
5	Linhagens obtidas a partir da cultura monospórica dos isolados selecionados	66
6	Características conidiais das linhagens selecionadas	70
7	Padrões de α e β esterases em diferentes linhagens selvagens	99
8	Atividade ligninolítica de algumas linhagens selecionadas, comparadas à <i>Phanerochaeta chrysosporium</i>	108
9	Etapas de conidiogênese da linhagem <i>Fusarium solani</i>	111
10	Observações citológicas das estruturas observadas durante a conidiogênese da linhagem de <i>Fusarium solani</i>	113
11	Curva de sobrevivência de <i>Fusarium solani</i> à luz ultra-violeta	116
12	Mutantes morfológicos de <i>Fusarium solani</i> , obtidos com 5% de sobrevivência à luz ultra-violeta	119

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Autor: Vânia Aparecida Vicente

Orientador: Profa. Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

No presente trabalho foram avaliados os aspectos biológicos básicos e as atividades lignocelulósicas de fungos isolados a partir de indústrias de celulose.

Para o isolamento foi descrito um método seletivo, obtendo um total de 115 isolados, dos quais 12 foram selecionados quanto a produção de celulase. Todos os isolados selecionados apresentavam atividades β -glicosidase (Salicinase), Exoglucanase (Avicelase) e Endoglucanase (CMCase) semelhantes à linhagem QM9414 de *T. reesei*. Quanto a atividade ligninolítica foi estabelecido um método preliminar identificando as linhagens de *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani*, como capazes de degradar lignina.

Os isolados selecionados foram classificados e caracterizados biologicamente envolvendo observações citológicas e avaliação do desenvolvimento, estabelecendo o período e as condições adequadas para o cultivo. Entre as linhagens analisadas somente *Trichoderma pseudokoningii* e *Fusarium solani* apresentaram conídios uninucleados. A avaliação do crescimento e esporulação das linhagens selecionadas em diferentes meios

de cultivo demonstrou que o pH é um fator limitante em meio contendo celulose como fonte de carbono e que todas as linhagens selecionadas podem ser utilizadas para se obter mutações auxotróficas, uma vez que se desenvolvem bem em meio mínimo.

Os padrões eletroforéticos para α e β esterase das linhagens selecionadas apresentaram diferentes perfis de bandas, permitindo correlacioná-los com as características morfológicas dos esporos das linhagens e serem utilizados como um dos parâmetros auxiliares na classificação dos fungos isolados.

Entre as linhagens selecionadas, a *Fusarium solani* foi considerada a melhor quanto a produção de enzimas lignocelulolíticas e se mostrou promissora para estudos genéticos e de melhoramento, uma vez que esta linhagem apresenta conídios brancos e uninucleados, facilidade na obtenção de mutantes morfológicos com luz ultra-violeta e crescimento em meio mínimo.

ISOLATION AND SELECTION OF
LIGNOCELLULOLYTIC FUNGI

Author: Vânia Aparecida Vicente

Adviser: Dr. Aline Aparecida Pizzirani - Kleiner

SUMMARY

This work was carried out aiming to evaluate the basic biological aspects and the lignocellulolytic activities in fungi isolated from cellulose industries.

It was described a selective isolation method and from a total of 115 isolates, 12 of them were selected according to their cellulase production. All the selected isolates showed β -glucosidase (salicinase), exoglucanase (avicelase) and endoglucanase (CMCase) activities similar to *Trichoderma reesei* QM9414 strain.

A preliminary method was established for testing ligninolytic activity and according to it, strains of *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani* are involved in the degradation of lignin.

The selected isolates were classified and biologically characterized according to cytological observations and their development evaluation leading to establish the best cultivation conditions. Among the analysed strains only *Trichoderma pseudokoningii* and *Fusarium solani* showed 100% uninucleated conidia. The evaluation of growing and

sporulation of the selected strains in different culture media showed that pH is the limiting factor in a medium containing cellulose as the sole carbon source. All the selected strains grow well in minimal medium and can be used to get auxotrophic mutants.

The α and β esterase electrophoretic patterns of the selected strains were shown to have different band profiles and it allows to correlate them with the spore morphological characteristics, and to be used as one of the useful parameters in classifying the isolated fungi.

Among the selected strains, *Fusarium solani* was considered to be the best lignocellulolytic enzymes producer and it might be very useful for further genetics and breeding studies since it has uninucleated white conidia, it is easy to induce UV morphological mutants and it grows very well in minimal medium.

1. INTRODUÇÃO

Com a crise energética dos "anos 70" e a obtenção de energia à partir de combustíveis fósseis não renováveis, que além do seu esgotamento, tem gerado sérios problemas ambientais devido a produção de dióxido de carbono, cria-se a necessidade da busca de compostos alternativos renováveis possíveis de serem utilizados como fonte de energia.

Sendo assim, tem se investido em processos que utilizam tais recursos e promovem uma reciclagem maior, como a utilização de resíduos florestais e agrícolas e até mesmo urbanos, que são acumulados diariamente na natureza.

Os materiais lignocelulósicos, constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina representam a maior porção do carbono fixado pela fotossíntese, onde somente uma pequena parte é reciclado rapidamente, sendo o restante, encontrado na forma de resíduos que podem perfeitamente serem aproveitados, através de processos que transformem esta matéria orgânica em monossacarídeos facilmente fermentáveis, ou ainda serem enriquecidos à nível protéico, gerando energia e alimento.

Os métodos utilizados para converter tais substratos compreendem sistemas físicos, químicos e biológicos. Em geral os métodos biológicos são operados em baixas temperaturas e pressão resultando num processo, em termos energéticos, economicamente compensável. Em vista disto, passou-se a motivar a bioconversão destes substratos.

A capacidade que tem certos microrganismos de produzir enzimas lignocelulolíticas é uma propriedade que vem sendo usada para obtenção de celulasas e ligninases com fins industriais. Porém para que a bioconversão se torne um processo economicamente viável, faz-se necessário obter linhagens capazes de hidrolisarem integralmente tais substratos em curto período de tempo e que possuam um sistema enzimático completo e balanceado.

O Brasil apresenta uma perspectiva interessante na busca de novas linhagens pois, sendo um país essencialmente tropical possui uma diversidade de ambientes com condições ideais para o desenvolvimento de linhagens com as propriedades citadas.

No presente trabalho realizou-se um estudo de isolamento objetivando-se:

- isolar fungos lignocelulósicos de cavacos de madeira que ficam estocados em indústrias de celulose;
- comparar a produção de enzimas dos fungos isolados com as normalmente utilizadas em processos industriais e selecionar as mais promissoras;
- domesticar tais fungos para as etapas do melhoramento genético (meios de cultivos adequados, temperaturas ótimas de crescimento e esporulação e aspectos citológicos).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os materiais lignocelulósicos, representam o principal depósito de energia fotossintética na natureza. Devido sua abundância na maioria dos ecossistemas terrestres, sua biodegradação é um evento importante no processo de ciclagem do carbono. Basicamente, esses materiais são compostos de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (SARKANEN & LUDWIG, 1971).

Na decomposição natural de materiais lignocelulósicos, tanto fungos quanto bactérias, desempenham um importante papel reduzindo estes à compostos de baixo peso molecular, que podem ser metabolizados por bactérias anaeróbicas facultativas ou obrigatórias do solo (BAZIN, 1976).

SHIMIDT (1978), estudando a sucessão e atividade de microrganismos em bagaços de cana estocados, verificou a presença de leveduras acompanhadas por bactérias, actinomicetos e fungos. Estes resultados indicaram que a degradação de lignocelulose na natureza ocorre através do ataque sucessivo de microrganismos. Diversos gêneros bacterianos são capazes de metabolizar lignocelulose, resultando um aumento considerável de proteínas no resíduo (DANIEL *et alii*, 1987; NJOKU & ANTAI, 1987; IYO &

ANTAI, 1988). Segundo ADHI *et alii* (1989), os Actinomicetos produzem uma série de enzimas envolvidas neste processo biodegradativo. No entanto, os fungos são considerados um dos melhores degradadores, pois alguns gêneros possuem a capacidade enzimática de degradar celulose, hemicelulose e outros componentes do material lignocelulósico, utilizando-se destes como fonte de carbono e energia (KIRK & CHANG, 1981; CRAWFORD & CRAWFORD, 1984).

TORZILLI & ANDRYKOVITCH (1985) avaliaram a degradação do tecido de *Spartina alterniflora* por culturas mistas e simples de fungos e verificaram que a cultura simples apresentava um potencial de degradação maior, embora ambas tenham degradado o substrato, sugerindo assim uma competição na degradação deste. ROLZ *et alii* (1987) estudaram a sacarificação e a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar por 12 gêneros de basidiomicetos, verificando uma perda de componentes como lignina, celulose e hemicelulose em cada tratamento, concomitantemente com o aumento da solubilização do bagaço. Estes autores sugeriram a utilização deste processo para a conversão de lignocelulose em alimento humano e ração animal. FRIEDRICH *et alii* (1986) verificaram que os gêneros *Trichoderma* e *Phanerochaeta* possuem a habilidade de bioconverter materiais contendo baixa quantidade de açúcares fermentáveis, porém rico em lignocelulose.

Comercialmente, existem dois sistemas biológicos que utilizam lignocelulose, a produção de biogás que tem sido explorada a centenas de anos na China, e a obtenção de cogumelos a partir de substratos sólidos (LEATHAM, 1982). Segundo BRODA (1986), para o aproveitamento biológico do material lignocelulósico, faz-se necessário obter processos

viáveis visando vencer a estrutura cristalina da celulose, que nem sempre é atacada por todos microrganismos, e as ligações intermonoméricas da lignina.

2.1. Celulose

2.1.1. Fontes naturais e estrutura química

A celulose é o principal constituinte da parede celular da maioria das plantas terrestres. O fruto do algodão é considerado uma das fontes mais importantes por conter celulose quase em estado puro, enquanto que nas paredes dos vegetais está associada com polissacarídeos (hemicelulose, pectina) e lignina (Tabela 1). Além destes, podemos citar uma série de resíduos que contêm celulose, como recursos florestais não utilizáveis, resíduos de madeira de indústrias de papel, resíduos agrícolas e urbanos, que não são ainda totalmente explorados, embora nos últimos anos, tem-se prestado considerável atenção ao seu aproveitamento através de hidrólise enzimática.

A degradação enzimática da celulose é determinada, principalmente, pela sua acessibilidade às enzimas. Sendo assim, qualquer característica estrutural que limite a ação de agentes hidrolíticos, refletirá no grau de hidrólise. Portanto, um conhecimento da composição de materiais celulósicos, assim como da estrutura das fibras de celulose é útil para a compreensão deste material como substrato em processos de bioconversão.

Tabela 1. Conteúdo de celulose de alguns produtos industriais e agrícolas (GOKSOYR & ERIKSEN, 1980)

Material	Porcentagem de celulose
ALGODÃO	91,0
MADEIRA	
. Abeto, Pino e Videiro	41,0
PALHA	
. Trigo	30,5
. Arroz	32,1
. Centeio	34,0
. Cevada	40,0
. Aveia	42,8
BAGAÇO	
. Bagaço completo	46,0
. Fibra do bagaço	56,6
. Medula do bagaço	55,4

A celulose é um polímero linear de glicose, composto de unidades de anidroglicose associadas umas às outras por ligações β -1-4 glicosídicas, sendo que o número de unidades na molécula pode variar (COWLING & BROWN, 1969; FAN *et alii*, 1980). Na natureza, a celulose está organizada em fibrilas, que consistem de diversas moléculas de celulose arranjadas de forma paralela e ligadas por pontes de hidrogênio. SHITOLA

& NEIMO (1975), verificaram que uma molécula pode ter áreas altamente ordenadas, regiões cristalinas, e áreas com um emaranhamento de fibras menos ordenadas, denominada de região amorfa.

2.1.2. Degradação microbiana da celulose

A capacidade de utilizar celulose como fonte de carbono e energia é encontrada entre eubactérias, actinomicetos e fungos (COUGHLAN, 1985). Segundo BISARIA & GHOSE (1981) e COUGHLAN (1985), microrganismos celulolíticos vem sendo frequentemente isolados e a produção de celulasas pelos mesmos tem sido estudadas. Entre os fungos, os gêneros mais estudados são *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Penicillium*, *Shizophyllum*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pleurotus*. Alguns gêneros bacterianos também são conhecidos por apresentarem essa característica, destacando-se *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*. Ainda, tem-se os microrganismos que são conhecidos pela sua capacidade de degradar celulose nativa e serem termofílicos como é o caso de *Chaetomium thermophile* var. *dissitum*, *Thermonospora curvata*, *Humicola* sp, *Thermoascus aurantiacus* e *Sporotrichum thermophile*. Segundo FENNIGTON *et alii* (1982) estes tipos de microrganismo oferecem vantagens na bioconversão em escala industrial, pois com a sua utilização, tem-se redução de contaminação, eliminação de patógenos, redução de custos com resfriamento e separação simplificada de sólido-líquido.

Entre os microrganismos produtores de celulasas, os fungos tem despertado maior interesse, pois geralmente suas enzimas são excretadas no meio de cultura, enquanto que nas bactérias estão ligadas à parede

celular, (WOOD, 1985). O gênero *Trichoderma* tem sido o mais estudado. AUGUSTINE (1976) isolou a linhagem QM6a de *Trichoderma reesei* de uma cartucheira em apodrecimento nas florestas da Nova Guiné que apresentava um grande potencial hidrolítico. Esse isolado foi submetido a um programa de melhoramento desenvolvido nos Estados Unidos pela U.S. Army Natick Research and Development Center e Universidade de Rutgers, obtendo-se linhagens com um complexo celular ativo e balanceado, como a QM9414, que tem sido utilizada como padrão na seleção de outros microrganismos com essa propriedade. SHEWALE & SADANA (1981) relataram a produção de celulase de um isolado de *Sclerotium rolfisii*, comparáveis ao *T. reesei* QM 9414. GOLDMAN & AZEVEDO (1987), analisaram a atividade celulolítica de 88 linhagens de *Trichoderma* spp, isoladas de solo do Estado de S.Paulo (Brasil), comparadas a linhagem QM9414 e selecionaram 23,9% dos isolados que não diferiam estatisticamente da linhagem utilizada como padrão.

Devido a grande extensão de celulose na natureza, microrganismos celulolíticos ocorrem em uma diversidade de ambientes. Baseado neste fato, alguns autores tem estudado uma variedade de resíduos celulósicos visando a busca de novas espécies celulolíticas e consequentemente um maior aproveitamento destes substratos. No isolamento destes microrganismos a aplicação de uma metodologia apropriada é fundamental. RAUTELA & COWLING (1966) descreveram um método que consiste de uma coluna contendo agar-celulose, onde o microrganismo é inoculado. Neste método, a profundidade da zona mais clara, indica o poder de degradação. HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1977) desenvolveram um meio sólido para seleção de microrganismos produtores de celulases. STWEART *et alii* (1985) utilizaram

celulose marcada para contagem de microrganismos celulolíticos em habitats anaeróbicos, visando a utilização destes. FONTY *et alii* (1989) estudaram o desenvolvimento da microflora celulolítica em ruminantes com dietas controladas e verificaram que estes desempenham um papel fundamental na digestão dos componentes utilizados na dieta. ANTUNES *et alii* (1986) estudando a biotransformação da palha de arroz verificaram fases distintas de desenvolvimento microbiano sendo o período de 90 a 120 dias, o de maior incidência de microrganismos celulolíticos. Já, VARDAVAKIS (1986) estudou a ocorrência destes microrganismos em diferentes profundidades do solo, verificando a presença de Actinomicetos, embora a incidência maior tenha sido de hipomicetos destacando-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

2.1.2.1. Complexo celulase

Modos de ação e propriedades do sistema enzimático

A hidrólise enzimática da celulose cristalina é um processo complexo envolvendo a participação de diversas enzimas. Este sistema apresenta diferenças entre os microrganismos, pois alguns são capazes de consumir celulose nativa, enquanto outros hidrolisam apenas seus derivados solúveis (ENAR, 1983).

REESE *et alii* (1950), realizaram os primeiros estudos sobre o mecanismo de ação das celulases e propuseram o conceito C_1-C_x , para a conversão de celulose natural à glicose. O componente C_1 era capaz de formar cadeias menores a partir da celulose nativa, que podiam então ser atacadas por C_x , que também hidrolisava derivados solúveis de celulose, sendo então C_x a celulase. Segundo este conceito, C_1 era considerado

um fator pré-hidrolítico, não necessariamente enzimático. Desde então, diversos estudos vem sendo feitos, no sentido de esclarecer o mecanismo de ação deste complexo enzimático, verificando que em muitos gêneros como *Trichoderma* (FARKAS *et alii*, 1982; WOOD & McCRAE, 1982), *Penicillium* (WOOD *et alii*, 1980) *Fusarium* (WOOD & McCRAE, 1977), *Aspergillus* (STERNBERG *et alii*, 1977) existe um sistema constituído pelo menos de três classes enzimáticas. Estas incluem a endo- β -1-4 glucanases (1,4- β -D-glucano 4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4), a exo- β -1-4 glucanase, geralmente uma celobioidrolase (1,4- β -D-glucanocelobiohidrolase - E.C.3.2.1.91) e a celobiase ou β -glicosidase (β -D-glucosideglucoidrolase - E.C.3.2.1.21). O modelo aceito atualmente quanto ao modo de ação dessas enzimas, é que estas atuam sinergicamente sobre a celulose nativa, onde as endoglucanases clivam ligações β -1-4 glucanases ao acaso, ao longo da cadeia de celulose, enquanto as exoglucanases hidrolisavam a celulose, liberando celobiose ou unidades de glicose, a partir das extremidades não reduzidas da cadeia do polímero. (WOOD e McCRAE, 1972; BERGHEM *et alii*, 1975; WOOD *et alii*, 1980; LEE e FAN, 1980; ERIKSSON, 1982; ENARI, 1983; COUGHALAN, 1985). As β -glicosidases hidrolisam celobiose e celooligossacarídeos de cadeia pequena à glicose, mas não degradam celulose (LEE & FANN, 1980).

A presença do sinergismo na ação hidrolítica entre esses componentes enzimáticos é evidente. Quando celobioidrolases, endoglucanases e β -glicosidases são separadas, não se observa atividade sobre celulose cristalina, mas esta é recuperada quando as misturas enzimáticas são reconstituídas (WOOD, 1985). FUJII & SHIMIZU (1986) estudando a cinética da atividade celulase, verificaram que o efeito sinérgico de endo e exoenzimas melhora a taxa de degradação de derivados solúveis de

celulose. Este efeito tem sido explorado entre diferentes espécies, uma vez que nem todos os microrganismos celulolíticos apresentam o sistema celulase completo. NYBERG & BAILEY (1980) utilizaram β -glicosidase de *Aspergillus* melhorando a degradação de celulase por *Trichoderma*. RAO *et alii* (1986), relataram um fator produzido por *Penicillium funiculosum* que estimula a produção de celulases no micélio de *Penicillium janthinellum*.

Métodos de purificação e fracionamento revelam que cada fração enzimática do sistema celulase ocorre em formas múltiplas, nos diferentes microrganismos produtores de celulases (WOOD e McCRAE, 1978; WOOD *et alii*, 1980; ERIKSSON, 1982; ENARI, 1983; LANGSFORD *et alii*, 1984; XIMENEX & FELIX, 1986; UCHOA *et alii*, 1986; LUPO & STUTZENBERGER, 1988; POULSEN & PETERSEN, 1989). Tem sido sugerido que a natureza e a origem da multiplicidade destes componentes possa ser determinado geneticamente (LABODOVA & FARKAS, 1983), ou ser causado por proteólise parcial (ENARI, 1983), ou ainda por glicosilações das proteínas (NAKAYAMA *et alii*, 1976, WILLICK e SELIGY, 1985). De acordo com COUGHLAN (1985) todas estas possibilidades parecem ocorrer.

Regulação

O mecanismo básico da regulação da síntese de celulase é semelhante aos sistemas enzimáticos indutíveis conhecidos. Os indutores reagem com as proteínas repressoras dentro das células causando a desrepressão da síntese de celulase (GONG e TSÃO, 1979). As respostas das células microbianas, aos diferentes indutores, variam, dependendo da

concentração e do tipo de indutor, do pH e do meio (MANDELS *et alii*, 1976; ROMANNELLI *et alii*, 1975). Entre os indutores conhecidos estão celulose, derivados da celulose, celobiose, soforose e lactose. Como a celulose, considerada o indutor universal da celulase, é um substrato insolúvel, não se sabe como ocorre sua entrada na célula. Alguns autores sugerem que deve ocorrer um contato físico entre a célula e o indutor insolúvel para que a indução ocorra. Tal fato, implica na existência de sítios de reconhecimento na superfície da célula que apresenta indução (RODRIGUES, 1987). No entanto, foi proposto a existência de uma síntese basal, onde pequena quantidade da enzima seria produzida pela célula e liberada para o meio (MANDELS & REESE, 1960). Posteriormente, foi verificado que *T. reesei* produz traços de celulasas, independentemente da presença do indutor e das condições de cultivo, indicando que a síntese basal de celulase é constitutiva (GONG *et alii*, 1979), sendo também relatada em outros microrganismos, como *Sporotrichum* (ERIKSSON & HAMP, 1978). Segundo KUBICEK (1981) e KUBICEK *et alii* (1988) o conídio de *T. reesei* apresenta níveis basais de endoglucanases, no qual permitem uma degradação inicial limitada de celulose. O produto desta degradação é convertida à soforose por β -glicosidase constitutiva ligada à membrana. Por outro lado, a síntese basal de celulasas fornece uma quantidade limitada de glicose e celobiose, sendo que este último será hidrolisado pela celobiase intracelular levando a um acúmulo de glicose e dessa forma a repressão. A glicose parece reprimir a síntese das endo e exocelulasas mesmo na presença de células ou outros indutores. Portanto, admite-se que geralmente as celulasas são enzimas adaptativas, ou seja, sujeitas a regulação genética através dos mecanismos de indução, repressão e repressão catabólica

(GOKSOYR & ERIKSEN, 1980).

2.1.2.2. Métodos para determinação da atividade celulolítica

A quantificação dos componentes do complexo celulase é de suma importância na avaliação dos microrganismos celulolíticos. No entanto, a principal dificuldade está na escolha dos substratos adequados a cada fração deste complexo enzimático.

COUGHLAN (1985) reúne uma série de métodos utilizados na detecção destas atividades. Celulase total, pode ser determinada através da liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise do algodão, pela perda de peso do substrato Avicel (avicelase), pela redução na turbidez da solução utilizando papel de filtro (atividade papel de filtro F.P.A.), pelo decréscimo nas fibras de "solka-FLOC", liberação de corante na presença de celulose-corante e pela clarificação do agar em agar-celulose. Endoglucanases são determinadas pela liberação de açúcares redutores, utilizando carboximetil celulose como substrato (CMcase), ou ainda através da clarificação de agar contendo celo-oligossacarídeos e CMcelulose. A atividade Exoglucanase geralmente é determinada pelo aparecimento de açúcares redutores no meio na presença de celulose amorfa, ou pela hidrólise de substratos celo-oligossacarídeos p-nitrofenil- β -D-glicosídeos, produzindo celobiose e p-nitrofenol como produto final. Celobiases (β -glicosidases) são medidas pela hidrólise de celobiose ou aril β -glicosídeos, tais como salicina ou p-nitrofenol- β -D-glicosídeos, originando como produtos finais glicose, saligemina e p-nitrofenol, respectivamente.

A presença de açúcares redutores no meio pode ser verificada pelos métodos colorimétricos, tais como ácido dinitrosalicílico-DNS (MILLER, 1959; NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952). No entanto, a cromatografia tem sido utilizada, na quantificação dos produtos de hidrólise, por oferecer maior precisão (SCHWALD *et alii*, 1988).

Segundo ENARI (1983), as celulasas hidrolisam não somente os mesmos substratos, mas também atuam sinergicamente, onde a atividade medida é grandemente influenciada pelas proporções em que as enzimas estão presente. Sendo assim, métodos de separação de enzimas, filtração em gel, cromatografia de troca iônica e eletroforese em gel de poliacrilamida, vem sendo utilizada na separação e caracterização de celulasas e β -glicosidases (UMEZURIKE, 1979). Além disto, FARGERSTAM & PETTERSON (1979), utilizaram um procedimento imunoquímico para detectar celulasas após separação eletroforética. Esse método envolve a estimativa de proteínas após imunoreação com antisoros específicos para endo e exoglucanases.

2.1.2.3. Fatores que influenciam a produção de celulasas

Os substratos são fatores determinantes na produção de enzimas. Vários resíduos celulósicos da agricultura têm sido avaliados como substrato adequado para a biossíntese de celulasas. Em *T. reesei*, foram testados grãos de cereais como farelo de trigo e milho, casca de arroz e bagaço de cana. A melhor produção foi obtida com farelo de trigo contendo sais minerais e carboximetil celulase (JABBAR & ILAHI, 1981). O actinomiceto *T. curvata* produz 16 vezes mais β -glicosidases quando crescido em proteína extraída de fibra lucerne em relação a outros substratos

como celobiose ou celulose purificada (BERNIER & STUTZENBERGER, 1988). No entanto, tais resíduos apresentam em média 40-60% de celulose, sendo o restante hemicelulose e lignina. A utilização de pré-tratamentos em determinados substratos, tem proporcionado um aumento na atividade hidrolítica. ACEBAL *et alii* (1986) obtiveram um aumento na produção de celulasas utilizando palha de trigo pré-tratada fisicamente. Já MARTIN *et alii* (1986) verificaram que o substrato madeira pré-tratada com vapor proporcionou uma elevação nos níveis de celulasas em *T. reesei*. KNAPPERT *et alii* (1981) relataram um aumento na produção de glicose por *T. reesei*, utilizando substrato celulase com tratamento ácido. Segundo MADAMWAR *et alii* (1989), a produção de celulasas e β -glicosidases por *Aspergillus niger* é melhorada com a utilização de celulose pré-tratada quimicamente.

Diferentes compostos relacionados com o crescimento, nutrição e produção de energia desempenham um papel fundamental na biossíntese de celulasas. HIGHLEY (1973), verificou que a produção de celulase extracelular por fungos da decomposição parda e branca foi afetada pela presença de carboidratos em meio de cultura líquido. De acordo com HERR (1979) a produção de β -glicosidase por *T. reesei* pode ser aumentada variando a fonte de carbono. FUKUDA *et alii* (1987) obtiveram um aumento da atividade β -glicosidase, utilizando como carboidrato, a substância laminar que contém ligações β -1-4-glicosídicas. Além dos carboidratos, fontes de nitrogênio complexas contendo aminoácidos, estimulam o crescimento e a produção de celulasas em *T. reesei* (RYU & MANDELS, 1980). É conhecido que o cálcio é requerido para a produção de celulasas por *T. reesei*, assim como a adição de ferro, manganês, zinco e cobalto aumentam a produção enzimática já existente (MANDELS & REESE, 1957).

O fator pH parece estar correlacionado com a atividade enzimática. STENBERG (1976), observou que a produção de celulasas em *T. reesei*, em meio com alta concentração de celulose, pode ser aumentada desde que haja um controle de pH. RYU e MANDELS (1980) relataram que o pH ótimo para o crescimento de *T. reesei* é aproximadamente 4.0 enquanto que para produção de enzimas é em torno de 3.0, sendo que abaixo desses valores as celulasas são inativadas. No entanto, o pH ideal para produção enzimática, varia de acordo com a fração enzimática em estudo e o microrganismo utilizado. Como exemplo, COSSAR & CANEVASCINI (1986) verificaram que a taxa de crescimento de *S. thermophile* de endoglucanases, varia de acordo com valores de pH. Assim como o pH, a temperatura é outro fator limitante para produção de celulasas. Observa-se que temperaturas ótimas de crescimento, diferem das ótimas para a produção, de acordo com a espécie estudada. Segundo WIDDEN *et alii* (1989) a temperatura e fontes de nitrogênio afetam diretamente a taxa de degradação de substratos celulósicos em espécies do gênero *Trichoderma*.

A influência de compostos surfactantes, definido como substâncias que alteram as propriedades da superfície de um líquido ou da interface de um líquido e um sólido, tem sido avaliada. CASTANON & WILKE (1981) verificaram que estas substâncias tensoativas, aumentam a taxa de sacarificação da celulose, na hidrólise enzimática de papel jornal por filtrado do *T. reesei* QM9414. OOSHIMA *et alii* (1986), concluíram que Tween melhora a função catalítica de exoglucanases. Segundo STUTZENBERG (1987) o substrato surfactante não iônico Tween 80 estimula a secreção de proteínas extracelulares em *T. curvata*. HUNG *et alii* (1988) estudaram o

efeito de Tween 80 na produção de celulases por *Trichoderma* verificando um aumento nos níveis destas. Esses resultados podem ser explicados pela hipótese de REESE (1950), segundo a qual substâncias surfactantes promovem modificações na permeabilidade da membrana, possibilitando uma maior excreção enzimática. Segundo OTTER *et alii* (1989), o Tween 80 altera os níveis de adsorção de celulases.

2.2. Lignina

2.2.1. Fontes naturais e estrutura química

A lignina geralmente é encontrada nos tecidos vegetais, principalmente entre a parede celular e células adjacentes, desempenhando múltiplas funções que são essenciais para a vida da planta. Ocorre de forma mais concentrada nos tecidos especializados de condução (vasos) e suporte (fibras). Além disto, confere maior resistência aos tecidos, contra a invasão por microrganismos patogênicos (SARKANEN & LUDWIG, 1971, ANDER & ERIKSON, 1978).

Quanto a estrutura química, a lignina é um polímero complexo de natureza aromática (Figura 1), constituído basicamente de macromoléculas polifenólicas de nove carbonos, denominadas de unidades fenilpropano, unidas por ligações não lábeis C-C e C-O-C (AMER & DREW, 1980). Sua massa molecular e composição variam de acordo com as espécies de vegetais, sendo insolúvel em água e muito resistente à reação química (SHEREVE & BRINK, 1980). Quando este polímero natural é submetido a tratamento enzimático, obtêm-se álcoois precursores como trans-coniferil,

trans-sinapil e trans-p-cumaril (SARKANEN e LUDWIG, 1971) (Figura 2).

Figura 1. Fórmula estrutural da lignina

álcool
p-cumaril

álcool
coniferil

álcool
sinapil

Figura 2. Álcoois precursores de lignina e nomenclatura dos carbonos

2.2.2. Degradação de lignina por microrganismos

Devido a grande complexidade da estrutura da lignina, em ambientes naturais, torna-se necessário o ataque de diversos microrganismos para que sua degradação seja significativa (AMER & DREW, 1980).

Em situações de excessiva umidade, a madeira está sujeita a um processo de apodrecimento que pode ser de três tipos, podridão branca, parda e mole, sendo que tal fenômeno é resultado da deterioração das paredes celulares por enzimas produzidas por microrganismos saprófitas.

Segundo CRAWFORD (1981), os fungos que causam podridão branca são conhecidos como os maiores decompositores, pois são capazes de degradar todos os componentes da madeira incluindo lignina. BLANCHETTE (1984), através de uma seleção, utilizando-se de microscopia eletrônica, verificou que 26 fungos responsáveis pela podridão branca, removiam lignina de coníferas e espécies de madeira dura. Segundo YANG *et alii* (1980) os basidiomicetos geralmente representam este grupo. Entre eles o mais estudado é o *Phanerochaeta chrysosporium*, pois possui um sistema enzimático capaz de degradar todas as formas de lignina, até CO₂ e componentes solúveis em água (REID *et alii*, 1982; CHUA *et alii*, 1983; LEISOLA *et alii*, 1983). Além deste, o basidiomiceto *Phlebia radiata* apresenta um potencial efetivo na degradação de lignocelulose (ANDER & ERIKSSON, 1977), possuindo a capacidade de degradar celulose e hemicelulose (HATAKKA, 1983) e produzindo peroxidases extracelulares envolvidas na degradação de lignina. (HATAKKA & TERVILÄ-WILO, 1985). Estes fungos, tem sido utilizados em estudos dos processos biodegradativos. BLONDEAU (1989) estudando a biodegradação natural e sintética de ácidos húmicos por *P. chrysosporium*,

verificou que o sistema ligninase é o responsável em parte na bioalteração. KIRKPATRICK *et alii* (1989) estudando processos de clarificação de polpa por *Coriolus versicolor*, verificaram que este remove lignina fisicamente através da invasão de suas hifas nas fibras e quimicamente pela degradação da lignina residual.

Os fungos responsáveis pela podridão mole, geralmente são os Ascomicetos e fungos imperfeitos, capazes de degradar lignina e materiais lignocelulósicos (DREW & KADAM, 1985; KIRK *et alii* 1978; JANSHEKAR *et alii*, 1982). Estes fungos penetram na parede celular formando cavidades cilíndricas na qual propagam suas hifas causando somente modificações lentas e pequenas na estrutura da lignina (BUSWELL & ODIER, 1987). Segundo BETTS & DART (1988) o gênero *Aspergillus* é um dos mais efetivos neste tipo de decomposição. Tem sido sugerido que os fungos que causam podridão mole são menos eficientes na degradação de lignina em relação aos da podridão branca. No entanto, DREW & KADAM (1979), verificaram que linhagens de *Aspergillus fumigatus* são superiores ao basidiomiceto *C. versicolor* no metabolismo de KRAFT-lignina. Segundo AMER & DREW (1980), os fungos amaciadores de madeira degradam a lignina, embora esta delignificação varie de acordo com a espécie e o tipo de substrato.

Segundo KIRK (1971) e ANDER & ERIKSSON, 1978 os fungos da podridão parda causam degradação limitada na estrutura da lignina. Estes são considerados colonizadores de madeira durante os estágios iniciais da decomposição, onde primeiro atuam sobre as frações de carboidratos promovendo assim remoção da parede celular das células vegetais.

Outros grupos de fungos não relatados como decompositores de madeira, tem sido considerados degradadores de lignina, (CRAWFORD & CRAWFORD, 1980; KADAM & DREW, 1986). Além dos fungos, bactérias também possuem esta atividade (CRAWFORD *et alii*, 1983; MCCARTHY & BRODA, 1984) tais como *Xantomonas* e *Aeromonas* que degradam lignina até CO_2 e água (AMER & DREW, 1980). Tem sido relatado que espécies do gênero *Streptomyces* promovem a despolimerização oxidativa da lignina (CRAWFORD & CRAWFORD, 1984). Posteriormente, GIROUX *et alii* (1988) verificaram a presença de enzimas extracelulares e intracelulares envolvidas na solubilização de lignina por *S. viridosporium*.

2.2.2.1. Ligninases

As enzimas ligninolíticas, chamadas de ligninases ou lignina-peroxidase, são hemoproteínas que utilizam peróxido de hidrogênio para gerar um complexo oxihemina que oxida a lignina (KEYSER *et alii*, 1978; TIEN & KIRK, 1983; KIRK *et alii*, 1986; RAMACHANDRA *et alii*, 1987, 1988; DURÁN & MANSILA, 1989). Este complexo captura um elétron dos núcleos da lignina gerando radicais cátion aromáticos, que por sua vez, são responsáveis pela quebra das cadeias laterais da lignina e posterior degradação em moléculas de baixo peso molecular, com a incorporação de oxigênio molecular (TONON & ODIER, 1988; DURAN & MANSILA, 1989). A revisão de BUSWELL & ODIER (1987), descreve uma série de reações catalisadas por lignina-peroxidases. Outras enzimas do grupo fenoloxidases, especialmente laccases, também parecem estar envolvidas na degradação de lignina. A dependência dessas enzimas no processo foi demonstrada por ANDER & ERIKSSON (1976).

Possivelmente enzimas laccases podem ser responsáveis pelas demetilações iniciais dos anéis fenólicos, onde os compostos resultantes, podem servir de substratos para oxigenases (ISHIHARA, 1981). As atividades fenoloxidasas são identificadas até o início da degradação da lignina (PLATT *et alii*, 1984).

A degradação de lignina em fungos ocorre durante o metabolismo secundário e é regulada pelo nível de ligninases, as quais são induzidas por seus substratos ou pelos seus produtos de degradação (FAISON & KIRK, 1985). Segundo ULMER *et alii* (1984) ocorre um aumento na produção de ligninases após a adição de lignina em culturas ligninolíticas. O álcool veratril (3,4 dimetoxibenzil), um metabólito secundário, produzido na presença de lignina por microrganismos ligninolíticos (LIWICK *et alii*, 1985) pode servir como substrato para ligninases (FAISON *et alii*, 1986). Segundo LEISOLA *et alii* (1984), em *P. chrysosporium* o álcool veratril estimula a degradação de lignina a CO_2 e compostos solúveis em água. Ainda, FAISON *et alii* (1986) sugeriram que este metabólito desempenha um papel regulatório no metabolismo da lignina via indução, porém afeta somente certas espécies de ligninases. Embora estas enzimas catalisem a formação deste metabólito, como radical cátion, este tem mostrado estimular a atividade, bem como a produção de ligninases (TONON & ODIER, 1988). O papel do álcool veratril ainda não foi bem esclarecido.

Múltiplas formas de ligninases tem sido isoladas (KWAHARA *et alii*, 1984; LEISOLA *et alii*, 1985a; LEISOLA *et alii*, 1985b; KIRK *et alii*, 1986; LEISOLA *et alii* (1987) purificaram 21 homoproteínas peroxidases de *P. chrysosporium*, dos quais 15 eram lignina-peroxidases. Em outros estudos

PASZCZYNSKI *et alii* (1986) demonstraram que o número de peroxidases variam consideravelmente, embora diferentes lignina-peroxidases sejam homólogas. NIKU-PAAVOLA (1987) separou proteínas extracelulares por pontos isoelétricos, em culturas estacionárias de *P. radiata*, identificando três lignina-peroxidases e uma oxidase. KANTELINEN *et alii* (1988) verificaram que as peroxidases de *P. radiata* reagiram com anticorpos produzidos contra peroxidases de *P. chrysosporium*, concluindo assim, que as ligninases dos dois fungos apresentam grande semelhança. Em bactérias a presença desta multiplicidade tem sido relatada. ADHI *et alii* (1989), verificaram que o sistema peroxidase de *Streptomyces badius* e *S. viridosporium* é constituído de quatro enzimas.

2.2.2.2. Métodos de ensaios da atividade ligninolítica

Diversos estudos vem sendo realizados no sentido de se obter substratos adequados para o desenvolvimento da atividade ligninases "*in vitro*". Da mesma forma, métodos apropriados vem sendo desenvolvidos para detectar a atividade ligninolítica e as enzimas envolvidas no processo.

Segundo AMER & DREW (1980), os métodos mais utilizados para a detecção de lignina e compostos relacionados são: 1) método do ácido sulfúrico (KLASON), baseado na insolubilidade de lignina neste ácido; 2) número KAPPA, responsável pela seletividade da lignina através da oxidação do permanganato de potássio; 3) cloração, avaliando o número de cloros substituídos na reação; 4) espectrofotometria com absorção em luz ultra-violeta.

Outros métodos tem sido desenvolvidos, como a aplicação de

radioisótopos, utilizando lignina marcada com C^{14} como substrato (KIRK *et alii*, 1975, 1978; KEYSER *et alii*, 1978), método quantitativo para analisar compostos intermediários da degradação de lignina, através da formação de um precipitado ácido do polímero lignina-APPL (CRAWFORD *et alii*, 1983), métodos de cromatografia para detectar a presença de produtos de degradação e a ocorrência de peroxidases no meio. (JANSHEKAR *et alii*, 1981, LEISOLA *et alii*, 1983). BETTS & DART (1988), estabeleceram por cromatografia líquida, uma sequência da degradação da lignina na presença de metanol como produto de demetoxilação. UMER *et alii* (1984), identificaram a atividade, através da descoloração do REMAZIL-BLUE-BRILLANTE. Técnicas eletroforéticas em géis de poliacrilamida (PAGE) e dodecil sulfato de sódio-acrilamida (SDS-PAGE) e Imunoeletroforeses foram utilizadas para a separação e caracterização de ligninases (RAMACHANDRA *et alii*, 1987; SREBOTINICK *et alii*, 1988). Homoperoxidases tem sido identificadas utilizando-se antisoro para lignina peroxidase purificada de *P. chrysosporium* (LEISOLA *et alii*, 1987).

2.2.2.3. Fatores envolvidos na biodegradação da lignina

Poucos são os conhecimentos a respeito dos fatores ambientais, nutricionais e fisiológicos que influenciam a degradação microbiana da lignina. O entendimento desses fatores, é importante para esclarecer os processos de decomposição da madeira; da formação de substâncias húmicas, carvão e petróleo; assim como para a exploração do potencial de organismos degradadores de lignina, nos processos de bioconversão da celulose. (KIRK *et alii*, 1978).

Tem sido relatado que *P. chrysosporium* e *C. versicolor*,

requerem um substrato de crescimento inicial, como glicose ou celulose, para metabolizar lignina até CO_2 (KIRK *et alii*, 1976). Segundo HALKETT *et alii* (1977) e KIRK & CHANG (1975) devido ao fato da degradação da lignina ser um processo oxidativo, o oxigênio desempenha um papel fundamental. KIRK *et alii* (1978), estudando a relação entre crescimento, esgotamento de carbono e decomposição de lignina por *P. chrysosporium*, sob uma atmosfera gasosa e variando as concentrações de oxigênio, observaram que a atividade ocorre sob concentrações mais elevadas de oxigênio, independente da fonte de carbono. Estes mesmos autores verificaram que a degradação ocorre preferencialmente em culturas estacionárias. FAISON & KIRK (1985) relataram que a agitação dificulta a difusão de oxigênio para o micélio, afetando a atividade. No entanto, LEISOLA *et alii* (1983) observaram que a espessura da camada micelial durante o crescimento em culturas estacionárias, também influencia a difusão de oxigênio. JAGER *et alii* (1985), analisaram em *P. chrysosporium* o efeito da adição de detergentes nas culturas submersas sob agitação e verificaram que com adição de Tween 80, ocorre uma atividade comparável às culturas estacionárias. Estes autores acreditam que o detergente atue fisiologicamente provocando alterações à nível de membrana ou induzindo o metabolismo secundário.

FENN & KIRK (1981), estudando os fatores que afetam a produção de ligninases em *P. chrysosporium* relatou que a glicose não causa efeito inibitório na produção das enzimas. No entanto, algumas investigações tem mostrado que limitações de carboidratos podem promover a degradação de lignina (JEFFRIES *et alii*, 1981). Segundo YANG *et alii* (1980) a alta concentração de glicose reduz a atividade em *P. chrysosporium* e *C. versicolor*. Dentro deste contexto TONON & ODIER (1988) propuseram

que a natureza da fonte de carbono influencia geralmente a atividade ligninolítica, por afetar a produção do peróxido de hidrogênio, o que pode levar a inativação de certas ligninases. Por outro lado, FENN *et alii* (1981) relataram que a inibição da atividade ligninolítica não está diretamente correlacionada com a fonte de carbono e sim com a quantidade de nitrogênio presente no meio. Foi verificado que em *P. radiata* a limitação de nitrogênio também estimula a atividade (HATAKKA & UUSI-RAUWA, 1983). Sendo assim, o nitrogênio é um nutriente limitante para o sustento e vigor da degradação (JEFRIES *et alii*, 1981; KEYSER, 1978; REID, 1979). Segundo FENN *et alii* (1981) o início da atividade pode ser atrasada pela adição de amônia e aminoácidos nitrogenados no meio. Porém KIRK *et alii* (1978) relataram que a fonte nitrogenada não apresenta influência significativa, mas sim a concentração destas substâncias é que determina efetivamente a taxa de degradação da lignina. Estes autores sugerem três possibilidades para a inativação da degradação pelo nitrogênio: 1) a alta concentração de N, pode promover um decréscimo rápido do substrato de crescimento necessário para o metabolismo da lignina; 2) metabolismo do nitrogênio compete com o metabolismo da lignina em alguns cofatores; 3) o nitrogênio atua regulando a síntese de um ou mais componentes deste sistema de degradação.

Fatores físicos podem afetar o sistema ligninolítico em *P. chrysosporium*, onde um ótimo pH para a atividade foi observado em torno de 4,5, sendo ineficiente abaixo de 3,5 e acima de 5,5 (KIRK *et alii*, 1978). Em outros microrganismos, como em *S. viridosporus*, o pH ideal é aproximadamente 7,0, embora a atividade extracelular não seja afetada à exposição ao pH 5,0 (GIROX *et alii*, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

3.1.1. Isolados

Os isolados no presente trabalho foram obtidos dos estoques de madeira e celulose das indústrias de celulose e papel RIPASA S/A e CHAMPION S/A e Indústria de Papel de Piracicaba (IPP).

3.1.2. *Trichoderma reesei* QM9414

Mutante celulolítico isolado do "U.S. Army Natick Development Center" - Natick - Estados Unidos (MANDELS *et alii*, 1971).

3.1.3. *Phanerochaeta chrysosporium* BKM-1767

Linhagem gentilmente cedida pelo Dr. T.K. KIRK (US FOREST Products laboratory, Madison, Wis.).

3.2. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e soluções utilizados foram esterilizados em autoclave por 20 minutos à 121°C com exceção das substâncias que sofrem efeito de altas temperaturas e/ou aquelas que não necessitam esterilização, as quais estão citadas na metodologia.

A incubação foi feita de acordo com a temperatura ideal para o desenvolvimento de cada linhagem empregada.

3.3. Meios de cultura e soluções utilizados

3.3.1. Meio Mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃	5,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10,0g
Ágar Difco	15,0g
Água destilada	1000ml
O pH foi ajustado p/ 6,8 com NaOH 10% (p/v)	

- 3.3.2. Meio completo (PONTECORVO *et alii*, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foram adicionados ao meio mínimo:

Peptona 2,0g
 Caseína hidrolisada 1,5g
 Extrato de levedura 0,5g
 Soluções de vitaminas 1,0ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10% (p/v).

- 3.3.3. Meio completo líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

Foi preparado de acordo com o item 3.3.2. não sendo adicionado ágar.

- 3.3.4. Meio Batata-Glicose-Ágar (BDA)

Infusão de Batata 200,0g
 Glicose 20,0g
 Ágar 15,0g

A concentração foi de 3,9% e o pH final foi de 5.6.

- 3.3.5. Meio de Enriquecimento e Isolamento para microrganismos celulolíticos (AARONSON, 1970)

KH_2PO_4 0,05g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05g
 NH_4Cl 0,05g

Celulose cristalina 5,0g

Ágar 18,0g

Água destilada 1000ml

O pH foi ajustado p/ 7,0 com NaOH 10% (p/v).

Após a autoclavagem foi adicionado:

Estreptomicina 0,03g

Desoxicolato de sódio 1,0ml

3.3.6. Meio Mineral para microrganismos celulolíticos - M.M.C.

(AMARAL *et alii*, 1967)

KH_2PO_4 7,0g

K_2HPO_4 2,0g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0g

Extrato de levedura 0,6g

Celulose cristalina 5,0g

Ágar 15,0g

Água destilada 1000ml

O pH foi ajustado p/ 7,0 com NaOH 10% (p/v).

3.3.7. Meio ágar celulose ácida - M.C.A. (preparado segundo

TANSEY, 1971)

KH_2PO_4 1,0g

K_2HPO_4 2,0g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0g
Extrato de levedura	0,6g
* Celulose ácida	5,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	100ml
Desoxicolato de sódio	1ml

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 10% (p/v).

* Celulose ácida:

Acrescentou-se aos poucos 30g de celulose pulverizada em 400,0ml de Ácido ortofosfórico (88%) e agitou-se por 2 horas em banho de gelo. A pasta formada foi ressuspensa em 2l de água destilada, bateu-se no liquidificador, e filtrou-se à vácuo em filtro Buchner com papel de filtro Whatman nº 1. Repetiu-se o procedimento por mais uma vez.

Ressuspendeu-se a celulose ácida em 1 litro de NaCO_3 2% e manteve-se por 12 horas. Após este período lavou-se em água destilada e filtrou-se por duas vezes. A celulose ácida foi mantida em refrigerador.

3.3.8. Meio farelo de Trigo (YOSHIOKA *et alii*, 1982)

Farelo de trigo	5,0g
Água de torneira	5,0ml

O meio foi autoclavado e conservado à temperatura ambiente.

3.3.9. Meio para atividade ligninolítica - M.L.A. (KIRK *et alii*, 1978, modificado)

Solução A:

D-glicose	10,0g
PO_4H_3 (2N)	10,9ml
NO_3NH_4	0,496 (*)
L. asparagina	0,890 (*)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1g
FeSO_4	10,0mg
Solução elementos traços ...	1,0ml (ver ítem 3.3.10)
Solução vitamina	1,0ml
Água destilada	500,0ml

(*) Para meio limitado de nitrogênio:

L. asparagina	89,0mg
NO_3NH_4	49,6mg

Solução B:

Lignina	1,0g
KOH	0,86g

Para meio limitado de nitrogênio:

Lignina	1,0g
KOH	0,53g

As soluções A e B foram autoclavadas separadamente. Depois foi adicionado A, lentamente, misturando com a solução B. Para o final

da solução, 50ml de solução tampão aquecida, foi adicionada, via membrana de filtro estéril. O tampão consiste em uma solução de succinato de sódio 0,6M (FENN & KIRK, 1981, modificado).

3.3.10. Solução elemento traço

Nitrato triacetato	1,5g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10,0mg
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	10,0mg
H_3BO_3	10,0mg
NaMoO_4	10,0mg
Água destilada	1000ml

3.3.11. Solução de Vitaminas

Biotina	0,20mg
Ácido p-amino benzóico	10,0mg
Tiamina	50,0mg
Piridoxina	50,0g
Ácido nicotínico	100,0mg
Riboflavina	100,0mg
Água destilada esterilizada	100,0ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4°C em frasco escuro sob clorofórmio.

3.3.12. Solução Salina (0,85% p/v)

NaCl 0,85g
 Água destilada 100,0ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco) e autoclavada.

3.3.13. Solução "Tween 80" (0,1 ou 10% v/v)

Tween 80 0,1 ou 10ml
 Água destilada 100,0ml

A solução foi distribuída em tubos de ensaio, 2,5ml por tubo, e a seguir autoclavados e mantidos no refrigerador a 4°C.

3.3.14. Solução Giemsa

Giemsa 1,0g
 Glicerina 66,0ml
 Metanol 66,0ml

A solução foi preparada pela adição de giemsa em glicerina a 60°C e, após resfriamento, à temperatura ambiente, foi adicionado metanol. Filtrou-se e conservou-se a solução à temperatura ambiente.

3.3.15. Solução de desoxicolato de sódio

Desoxicolato de sódio 8,0g
 Água destilada 100,0ml

Autoclavada e mantida em refrigerador.

3.3.16. Solução de salicina (D-Salicin, Riedel-de-Haen) 1% (p/V)

Dissolveu-se 1g de salicina em 80ml de tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e completou-se o volume para 100ml com tampão acetato 0,05M, pH 5,0. Conservada a 4°C.

3.3.17. Solução C

Solução de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1N 100ml

Solução de CuSO_4 1% 1ml

Solução de tartarato de Na e K 1% 1ml

A solução foi preparada por homogeneização de seus componentes, no momento de ser utilizada.

3.3.18. Reagente ácido dinitrosalicílico (DNS)

Ácido 3,5 dinitro salicílico 1,0g

Solução de hidróxido de sódio 2N. 20,0ml

Água destilada 20,0ml

Após dissolução dos reagentes adicionou-se:

Tartarato de sódio e Potássio ... 30g

O volume foi completado para 100,0ml com H_2O destilada e a solução conservada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.3.19. Reativo de Folin - Ciocalteau (Laborclin Ltda)

O reativo foi diluído 1:1 em água destilada.

3.3.20. Estoque de Acrilamida

Acrilamida 75,0g
N, N metilene-bis-acrilamida 2,0g
Água destilada 250,0ml

A solução foi filtrada e mantida a 4°C.

3.3.21. Tampão do gel separador pH 8,9

Tris-base 45,75g
Água destilada 60,0ml

O pH foi ajustado para 8,9 com HCl 1N, e o volume completado p/ 100ml com água destilada. A solução foi filtrada e armazenada à temperatura ambiente.

3.3.22. Tampão do gel Empilhador pH 6,8

Tris-base 7,475g
Água destilada 60,000ml

O pH foi ajustado para 6,8 com HCl 1N e o volume completado para 100ml com água destilada.

A solução foi conservada sob refrigeração.

3.3.23. Tampão do Tanque

Tris 63,2g
Glicina 39,9g
Água destilada 1000ml

A solução foi filtrada e armazenada à temperatura ambiente no momento do uso, este tampão foi diluído 1:10 com água destilada.

3.3.24. Tampão da amostra

Glicerol 5,0ml
 Tampão do gel empilhador 2,5ml
 Azul de bromofenol cristais

O volume foi completado para 25ml com água destilada e armazenou-se a -20°C .

3.3.25. Gel separador a 10%

Tampão do gel separador 3,0ml
 Acrilamida 10,0ml
 Água desmineralizada 16,8ml
 Persulfato de amônia 10% 0,225ml
 TEMED 0,01ml

O gel foi preparado no momento do uso.

3.3.26. Gel empilhador 4%

Tampão do gel empilhador 1,5ml
 Acrilamida 2,0ml
 Água desmineralizada 11,4ml
 Persulfato de amônia 10% 0,112ml
 TEMED 0,015ml

O gel foi preparado no momento do uso.

3.3.27. Fixador PAGE

Soluções substratos

α -naftil-acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

β -naftil-acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

Estas soluções podem permanecer estocadas no refrigerador durante alguns meses a -4°C .

3.3.28. Corante-esterase

"FAST BLUE, RR" 50,0mg

Tris-HCl 0,5M pH 7,1 5,0ml

α -naftil-acetato 0,75ml

β -naftil-acetato 0,75ml

Água destilada 43,5ml

3.3.29. Tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0

Acetato de sódio 4,1015g

Água destilada 800,0ml

O pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético glacial e o volume completado para 1000,0ml com água destilada. A solução foi conservada em refrigerador a 4°C .

3.3.30. Tampão Fosfato pH 7,0

Solução A:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,73g

Água destilada 1000,0ml

Solução B:

KH_2PO_4 2,40g

Água destilada 1000,0m

A solução A foi misturada com a solução B na proporção 7:3, o pH foi ajustado para 7,0 e a mistura conservada em refrigerador a 4°C.

3.4. Isolamento dos fungos

Os isolados foram coletados em três diferentes indústrias de celulose. Foram feitas coletas dos estoques de madeira, pilhas de cavacos e da própria celulose sendo que esses materiais foram levados para o laboratório em recipientes esterilizados.

Os fungos foram isolados pela transferência do material obtido diretamente para as placas contendo meio de cultura para isolamento de fungos celulolíticos por estrias e também através de diluições do material em solução salina e, posteriormente, semeadura em placas contendo o mesmo meio citado acima. Isolados purificados foram obtidos através de várias réplicas em meio mineral para microrganismos celulolíticos.

Os materiais coletados das regiões externas dos estoques de madeira e pilhas de cavacos foram incubados a 28°C, e os das regiões mais internas foram incubados a temperaturas mais elevadas, 37 e 44°C.

3.5. Nomenclatura e manutenção das linhagens

As amostras isoladas foram denominadas de fungos celulíticos (FC) seguidas de números com a finalidade de diferenciá-las (FC₁, FC₂, ..., FC₁₁₅).

A manutenção dos isolados foi efetuada através de repiques periódicos em meio completo e celulose-ágar e, posteriormente, estocados em tubos contendo meio completo e conservados em refrigerador.

3.6. Avaliações das condições de cultivo

As condições de cultivo para cada isolado foram estabelecidas de acordo com o desenvolvimento em meio mineral, variando temperaturas e intervalos de tempo. Para tal avaliação utilizou-se um delineamento em fatorial inteiramente casualizado, com três fatores e três repetições. Os fatores foram: Fungos (isolados), Temperatura (3 níveis: 28, 37, 44 graus centígrados) e tempo (3 níveis: 3, 5, 7 dias).

3.7. Seleção em placa (Baseado no método semi-quantitativo estabelecido por MONTENECOURT & EVELEIGH, 1977b)

Após selecionada a temperatura e o tempo de cultivo ideal para o desenvolvimento de cada isolado, estes foram avaliados quanto a produção de celulase em placas contendo meio para visualização do halo de degradação de celulose (item 3.3.7) com o redutor de colônia desoxicolato de sódio. Foram inoculadas três colônias por placa e estas mantidas em incubação durante 5 dias. Posteriormente, o material foi submetido a um choque térmico de 50°C durante 18 horas, para revelação do halo.

A atividade enzimática foi expressa pela área total de degradação, obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Área do halo} = \pi/4 \times (D^2 - d^2)$$

Para cada coleta foi feita uma seleção dos isolados em relação à linhagem *T. reesei* QM9414, utilizando um delineamento inteiramente casualizado.

3.8. Caracterização das linhagens

3.8.1. Obtenção de isolados monospóricos (TANAKA, 1986)

Foram feitas suspensões em Tween 80 dos isolados selecionados, de acordo com o item 3.7, e com o auxílio de uma alça de platina, os mesmos foram inoculados no centro de uma placa contendo meio completo. Após a germinação dos esporos uma lupa e fio de platina foram utilizados, sob condições estéreis, para transferir um só esporo para um novo meio de cultura, obtendo colônias monospóricas, denominadas de linhagens.

3.8.2. Classificação das linhagens

As linhagens selecionadas produtoras de celulases, foram encaminhadas para a Prof^a Maria José dos Santos Fernandes do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco-Recife, as quais foram classificadas.

3.8.3. Técnica citológica (TANAKA *et alii*, 1979)

Nas linhagens selecionadas foram realizadas observações citológicas através da coloração de núcleos, estimando-se o número de núcleo por esporos. Para estes estudos as linhagens foram previamente cultivadas em M.C. durante 5 dias.

TANAKA, Y., 1986. Comunicação pessoal.

Esporos das referidas linhagens foram aderidos a lamínulas através de solução de albumina, utilizando-se para fixação, uma solução de álcool-ácido-acético 3:1, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool 95% e 70%, procedendo-se, em seguida, a hidrólise em ácido clorídrico 1N a 60°C, variando o tempo de hidrólise de acordo com a linhagem. Os esporos foram corados por imersão em solução Giemsa, diluída de 1 para 6 com tampão fosfato 0,02M pH 7,0, durante 20 a 30 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão. Para observações microscópicas foi utilizado o microscópio Olympus, modelo BHS, associado ao sistema fotomicrográfico Olympus modelo PM-10AD, quando necessário.

3.8.4. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Meio Completo, BDA, Meio Mínimo. A inoculação das linhagens foi feita no centro da placa contendo cada meio de crescimento. A avaliação deste crescimento foi feita pela medida do diâmetro em milímetros das colônias com 120 horas de incubação.

3.8.5. Avaliação do melhor pH para o crescimento e esporulação em meio mineral e meio completo

Os esporos das linhagens selecionadas foram inoculados com auxílio de uma alça de platina no centro da placa contendo meio celuloze cristalina e meio completo, em diferentes pHs.

A variabilidade no crescimento, apresentada pelas linhagens, foi verificada através da medida do diâmetro das colônias (mm) com 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento.

Para a determinação da quantidade de esporos produzidos por cada linhagem, três discos de 0,7cm de diâmetro cada um, foram retirados da colônia após 96 horas de crescimento e colocados em tubos com 2,5ml de solução Tween 80. Após agitação para desagregar os esporos, o seu número foi estimado pela contagem em câmara de Neubauer e a produção avaliada em relação à área da colônia através da seguinte relação:

$$\frac{\emptyset \text{ disco}}{\emptyset \text{ colônia}} = \frac{\text{esporulação da linhagem (média de 3 contagens)}}{x}$$

$$\emptyset \text{ colônia} = \text{-----} x$$

x = esporulação da colônia

Para tal experimento, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três fatores (Fungo, tempo e pH).

3.8.6. Avaliação da influência do pH na produção de halo

As linhagens selecionadas foram avaliadas quanto a produção de halo em diferentes pHs. O parâmetro analisado foi a área de degradação em meio contendo celulose ácida, seguindo o mesmo procedimento do item 3.7, porém variando o pH.

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial inteiramente casualizado, com dois fatores: linhagem e pH.

3.8.7. Caracterização para padrões de esterase (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.8.7.1. Extração de proteínas e preparo das amostras para eletroforese

Esporos das linhagens testadas foram coletados em solução de Tween 80 e inoculados em frascos Erlenmeyers de 125ml contendo 50ml de meio completo líquido (item 3.3.3), e inoculados durante 7 dias, de acordo com as condições estabelecidas no item 3.6. Após a incubação a película micelial formada foi filtrada à vácuo em filtro de Buchener, lavando-se o micélio, três vezes, com água destilada, para a retirada do meio de cultivo. Após a filtração o micélio foi levemente seco com papel de filtro, avaliando-se o peso em gramas. Para cada 300mg de micélio, adicionou-se 1ml do tampão gel empilhador (item 3.3.22) e triturou-se em homogeneizador elétrico por 5 minutos, mantendo-se as amostras sempre em banho de gelo. O extrato obtido foi conservado em banho de gelo, em refrigerador, por 12 horas, para completar a extração. Em seguida centrifugou-se a 12000g por 20 minutos, em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes, extratos proteicos, foram transferidos para frascos, vedados e conservados em congelador.

Retirou-se uma parte do extrato proteico (0,5ml) e misturou-se com uma parte do tampão da amostra (0,5ml), onde aplicou-se 50µl de cada amostra nas canaletas do gel. Cada amostra foi aplicada em duas cavidades consecutivas do gel, como repetições.

3.8.7.2. Preparo do gel acrilamida

As placas foram montadas em sistema vertical e vedadas com ágar-água (4%). Preparou-se o gel separador à 10% (item 3.3.25), vertendo-o na placa com o auxílio de uma seringa de vidro. A quantidade do gel separador foi calculada para atingir 4,5cm da extremidade superior do gel. O restante foi preenchido com água desmineralizada. Uma vez polimerizado o gel verteu-se a placa deixando escoar a água. Preencheu-se o restante da placa com a solução do gel empilhador (3.3.26). O pente foi imediatamente introduzido sobre este gel e conservou-se a temperatura ambiente, para a polimerização. A seguir, retirou-se o pente e lavou-se os poços com tampão do tanque (3.3.23), fixando-se a placa a cuba de corrida. As amostras foram aplicadas nos poços com auxílio de micropipetas e com uma pipeta Pasteur, completou-se os poços, com tampão do tanque diluído (1:10). Uma vez preenchidos os poços, completou-se o tanque superior da cuba com o tampão do tanque. Sob refrigeração, o conjunto foi ligado à fonte, iniciando-se a corrida com 100 volts até o material atingir o gel separador, neste ponto, elevou-se a voltagem a 200V, até o final da corrida.

3.8.7.3. Coloração para revelação da atividade esterase

O gel de poliacrilamida foi retirado da placa e incubado em solução corante (item 3.3.28), a temperatura ambiente até as bandas aparecerem. Posteriormente, o gel foi lavado em água e fixado em solução aquosa de glicerol 10% v/v.

3.9. Determinação da atividade celulase

3.9.1. Cultivo em meio semi-sólido (YOSHIOKA *et alii*, 1982)

As linhagens selecionadas foram cultivadas em meio semi-sólido para a determinação das atividades enzimáticas. A partir de colônias crescidas em meio completo durante 7 dias à temperatura ideal de cada linhagem, preparou-se suspensões aquosas contendo 10^7 esporos/mililitro, os quais foram inoculados 5ml em meio farelo de trigo. Após cinco dias de cultivo foi efetuada a extração das enzimas, por adição de água gelada esterelizada permanecendo num banho de gelo durante 3 horas. A seguir o conteúdo foi agitado com um bastão de vidro e o sobrenadante foi separado por filtração e utilizado como fonte de enzimas (ESQUEMA-1).

3.9.2. Ensaio enzimáticos

Métodos colorimétricos foram usados para determinação das atividades enzimáticas e dosagem de proteínas. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro Micronal B-382. A Figura 3 descreve as retas padrões utilizadas na determinação das atividades enzimáticas e dosagens de proteínas totais, estimadas por regressão linear.

3.9.2.1. Determinação das atividades celulasas

A atividade exoglucanase (avicelase) foi determinada, utilizando-se celulose microcristalina (Avicel-RIEDEL de HAËN como substrato) enquanto que para a determinação da atividade endoglucanase, utilizou-se como substrato carboximetil celulose-CMC (Tipo CM-23 FLUKA, A.G.). A cada 50mg de substrato, adicionou-se tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0 e extrato aquoso da cultura (obtido de acordo com o item 3.9.1) de modo a completar o volume para 5,0ml. Incubou-se a mistura a 50°C e, nos intervalos apropriados. A reação foi interrompida com a retirada de 1ml desta amostra, transferindo-a para tubos contendo 1ml do reagente DNS, o substrato não hidrolisado foi separado por centrifugação. A seguir foi determinado o teor de açúcares redutores liberados, submetendo a mistura de reação a banho-maria por 5 minutos e após resfriamento foi diluída com 10,0ml de água e procedeu-se a leitura de absorbância a 540nm contra o branco (MILLER, 1959) (ESQUEMA 1).

A glicose foi utilizada como padrão (Figura 3B) e a atividade enzimática expressa como número de atividades por miligrama de proteínas totais. Definiu-se unidade enzimática como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor, por hora, nessas condições.

3.9.2.2. Determinações da atividade β -glicosidase

Para determinação da atividade β -glicosidase (salicinase), utilizou-se como substrato 0,5ml de solução de salicina 1% em tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,0. O extrato aquoso da cultura (obtida no item 3.9.1), adequadamente diluído, foi adicionado de modo a completar o volume

a 1,0ml, incubando-se, a seguir, a mistura de reação a 50°C. Em intervalos de tempo adequados, a reação foi interrompida, por adição de 1,0ml do reagente DNS, e o produto formado foi quantificado como anteriormente descrito. Os passos que sucederam estas etapas foram iguais aos descritos no item 3.9.2.1 (ESQUEMA 1).

3.9.2.3. Dosagem de proteínas (LOWRY *et alii*, 1951)

Para dosagens foram tomados alíquotas do extrato aquoso da cultura, obtido no item 3.9.1 adequadamente diluído, completando-se o volume a 1,0ml com água destilada. Em seguida, adicionou-se 5,0ml da solução C, e, após 15 minutos, foi acrescentado 0,5ml do reagente de Folin ciocalteau diluído de 1:1 com água destilada. Decorridos 30 minutos, procedeu-se a leitura da absorbância a 660nm contra o branco (Esquema 1). A concentração de proteínas extracelulares totais no filtrado de cultura, foi determinada, usando soroalbumina bovina (SAB) como padrão (Figura 3A).

3.9.2.4. Delineamento utilizado

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial com dois fatores (Enzimas e linhagens).

Figura 3A

Figura 3B

Figura 3. Retas padrões utilizadas para a determinação das atividades enzimáticas (r - correlação; a - intercepto; b - inclinação)

3.10. Avaliação da atividade ligninolítica

3.10.1. Obtenção do substrato lignina a partir de bagaço de cana-de-açúcar

A obtenção da fração lignina obtida a partir de bagaço de cana-de-açúcar, foi feita através do método estabelecido por KIRK *et alii* (1978) modificado por CARRAU *et alii* (1987).

O bagaço de cana-de-açúcar foi moído e pulverizado a 24 mesh. Foi feita uma suspensão deste substrato em hidróxido de sódio 4% e autoclavou-se por uma hora. Em seguida a suspensão autoclavada foi filtrada, e o sobrenadante diluído com etanol na proporção de 1:1, sendo a seguir incubado por uma noite à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugou-se a 38.720g por 10 minutos e o sobrenadante foi precipitado por redução do pH para 3,0 com HCl 1N, ocorrendo a precipitação de lignina. Foi realizada uma lavagem com água destilada pH 3,0 e procedeu-se a secagem em liofilizador.

Após o substrato purificado, pesou-se 4mg, 8mg e 16mg e ressuspendeu-se em NaOH 0,55% e fez-se a leitura em espectrofotômetro Microanal B-382. Os resultados obtidos foram comparáveis aos dados da literatura comprovando a obtenção da fração solúvel de lignina, utilizada como substrato no meio M.L.A. (item 3.3.9).

3.10.2. Inóculo e cultivo

Uma suspensão de esporos, diluída em salina para concentração de 8×10^6 esporos/ml, foi utilizada como inóculo em 5ml de M.L.A.

limitado de nitrogênio, obtido de acordo com o item 3.3.9, na proporção de 1:1, distribuídos em Erlenmeyer de 500ml, para maior aeração. Após o inóculo, incubou-se à temperatura ideal de cada fungo e, a cada intervalo de 24 horas, fez-se aeração com ar atmosférico em fluxo laminar.

3.10.3. Quantificação da degradação da lignina (JANSHEKAR *et alii*, 1981, modificado por CARRAU *et alii*, 1987)

A quantificação da degradação foi feita através de análise residual do substrato na absorbância ultra violeta à 281nm em espectrofotômetro marca Micronal B-382.

A cada frasco cultivado de acordo com o item 3.10.2, foram adicionados 30ml de NaOH 0,55%, em seguida o conteúdo foi macerado por dez segundos e então centrifugou-se à 38.720g por 15 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi precipitado em pH 3,0 com HCl, durante uma noite. Posteriormente a operação de centrifugação foi repetida e ressolubilizou-se o precipitado obtido em 5ml de solução de hidróxido de sódio 4%. Foram determinadas as quantidades de lignina presente no início do cultivo, em intervalos a cada dois dias, durante dez dias. Em seguida, determinou-se a porcentagem de lignina degradada que foi representada graficamente.

3.11. Observações de etapas da conidiogênese da linhagem *Fusarium solani*

A linhagem foi inoculada por estrias, nos quatro bordos de lâminulas esterilizadas, colocadas sobre o meio completo em placas de

Petri (SOUZA, 1979). Fez-se observações com intervalos de tempos de 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas.

As lamínulas foram retiradas com auxílio de uma pinça, a cada intervalo de tempo e levada ao microscópio. As estruturas foram observadas a fresco e feitos desenhos esquemáticos. Posteriormente, fez-se a coloração das estruturas pelo método desenvolvido por TANAKA *et alii*, 1970 (item 3.8.3) e fotografou-se.

3.12. Sobrevivência à luz ultravioleta

Uma suspensão de conídios de *F. solani* em torno de 10^7 conídios /ml foi diluída em solução salina para uma concentração 1×10^6 conídios por ml estimada em hematímetro. O volume de 10ml dessa suspensão de conídios foi colocado em uma placa de Petri esterilizada à distância de 14cm da fonte de luz ultravioleta marca Mineralight-115 volts, da Ultra-Violet Prod. Inc. (San Gabriel - Califórnia - USA). Antes do início da irradiação uma alíquota de 1ml do volume da placa foi retirada, a qual foi empregada como controle (100% de sobrevivência). A placa foi exposta durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 minutos à fonte de luz ultravioleta. Uma alíquota de 1ml foi retirada da placa, após cada período de irradiação. Essas alíquotas, assim como as do controle, foram convenientemente diluídas em soluções salinas e 0,1ml de cada solução foi semeado em placas com meio completo contendo 0,08% de desoxicolato de sódio, e incubados a 28°C. Toda a irradiação e as posteriores diluições do material foram realizadas no escuro; as placas foram protegidas por papel opaco durante as primeiras 24 horas de incubação. A contagem das colônias isoladas foi efetuada após esse período,

estimado o número de sobreviventes para cada tempo de exposição. Os dados foram expressos graficamente (por uma curva logarítmica) em papel monolog.

3.12.1. Isolamento de mutantes morfológicos

As colônias com alterações morfológicas, surgidas durante a exposição à luz ultra-violeta (item 3.12) foram isoladas por réplica em meio completo e fotografadas.

3.13. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente através dos testes F e Tukey ao nível de 1% e 5% de probabilidade, segundo os delineamentos experimentais dos ensaios.

Nos experimentos fatoriais em que as interações desejadas foram significativas, apresentou-se um único quadro de variância contendo a decomposição dos graus de liberdade da interação utilizada acrescidos dos graus de liberdade do fator fixado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento dos fungos

No isolamento inicial dos fungos utilizou-se o meio mineral de isolamento e enriquecimento para microrganismos celulolíticos sem a fonte carbono. Esse procedimento foi utilizado com a finalidade de se obter fungos produtores de celulasas e ligninases e, por essa razão, a fonte de carbono foi substituída pelo próprio material lignocelulósico coletado nas indústrias. Tais modificações foram necessárias, pois utilizando o meio original citado predominariam os microrganismos celulolíticos. As colônias morfológicamente diferentes crescidas neste meio foram transferidas para o mesmo, contendo celulose cristalina e então purificadas. O isolamento dos respectivos fungos foi realizado em pátios de indústrias de celulose, ambiente no qual a diversidade de microrganismos é muito grande. Como no nosso caso, o objetivo era selecionar fungos, utilizou-se estreptomicina no meio de cultura para evitar o crescimento de bactérias.

Foram realizadas quatro coletas, nas quais um total de 115 linhagens de fungos potencialmente lignocelulósicos (Tabelas 1, 2, 3 e 4 do Apêndice) foram isolados.

Entre os isolados purificados, observou-se uma variabilidade morfológica grande, indicando a obtenção de diversos gêneros degradadores de celulose, sendo que alguns ocorreram com maior frequência. Nos estoques de madeira em decomposição, observou-se uma grande incidência dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e alguns basidiomicetos, enquanto que nas pilhas de cavacos de madeira a maior ocorrência era de *Aspergillus fumigatus*. O gênero *Penicillium* ocorreu em todos os ambientes. No substrato celulose predominaram os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Muitos organismos podem se desenvolver na presença do substrato celulose ou degradar regiões amorfas e derivados solúveis desta, mas poucos produzem o sistema enzimático completo que pode efetivar a hidrólise extensiva da celulose natural (STEMBERG, 1976 e GROLEU & FORSBERG, 1981). As 115 linhagens obtidas são potencialmente celulolíticas, pois foram isoladas em um meio seletivo. No entanto, estas foram submetidas a um processo de seleção, visando as características biológicas de cada isolado, com a finalidade de se obter maiores informações sobre as linhagens e se possível a identificação das portadoras de um sistema hidrolítico completo.

Para a caracterização biológica dos isolados foram aplicados os seguintes critérios: 1) crescimento e produção de enzimas em um período de tempo relativamente curto; 2) utilização de meios de cultivo contendo como única fonte de carbono, a celulose cristalina e ou uma fonte de carbono com tratamento químico, a celulose ácida, para a avaliação da capacidade celulolítica; 3) estudo do crescimento em uma ampla margem de temperatura, visando futuras utilizações dessas linhagens nos processos de

produção de celulases; 4) avaliações citológicas; 5) estudos das atividades enzimáticas envolvendo a degradação de celulose e lignina.

4.2. Determinações das condições de cultivo

Para que a hidrólise enzimática seja efetiva os microrganismos devem ser cultivados sob condições ideais de desenvolvimento, não alterando portanto, o seu metabolismo. Estas condições de cultivo foram estabelecidas em meio mineral, contendo celulose cristalina como fonte de carbono (item 3.3.6).

Nas Tabelas 5, 9, 13, 17 do Apêndice, encontram-se os resultados do crescimento em mineral para microrganismos celulolíticos, variando temperatura e tempo de desenvolvimento para cada isolado. De acordo com as análises de variância, Tabelas 6, 10, 14 e 18 do Apêndice, foi observado interações significativas entre os fatores tempo, temperatura e linhagens. Nas Tabelas 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19 e 20 do Apêndice, pode-se verificar o tempo e a temperatura ideal de desenvolvimento para cada isolado, de acordo com as médias de crescimento neste meio. No geral, o melhor tempo de cultivo foi estabelecido como sendo o período de 7 dias, embora a maioria dos isolados apresentaram colônias com um crescimento radial significativo no nível de 5 dias de incubação. Entre os isolados a maioria das amostras são mesofílicas e termofílicas facultativas, não foi encontrado nenhum termofílico obrigatório.

4.3. Seleção em placas

Os isolados foram selecionados quanto a capacidade hidrolítica pelo teste semiquantitativo em placas baseado em MONTENECOURT & EVELEIGH (1977b) que consiste na hidrólise de celulose ácida na presença de redutor de colônia, permitindo avaliar um número grande de colônias por placas.

Segundo BRANDT (1975), mudanças na estrutura da celulose afetam sua suscetibilidade ao ataque enzimático, alterando a cristalinidade e o grau de polimerização. A natureza do substrato utilizado neste ensaio, pré-tratado via ácida, permitiu quantificar a presença de enzimas extracelulares através da visualização de halo no meio (Figura 4).

Figura 4. Visualização do halo de degradação em celulose ácida

Durante o ensaio utilizou-se o redutor de colônia desoxicolato de sódio, na concentração de 0,08%, a mesma estabelecida para *Aspergillus nidulans* por MACKINTOSH & PRITCHARD (1963), tal concentração demonstrou-se eficiente pois reduziu consideravelmente o diâmetro das colônias, sem causar alterações morfológicas drásticas nos diferentes isolados.

De acordo com MONTENECOURT & EVELEIGH (1977b) com a utilização do redutor é possível avaliar um número maior de colônias por placa, facilitando no caso de ensaios semi-quantitativos.

A avaliação da produção de exoenzimas tem sido estimada pelo índice enzimático, que consiste na razão da medida do diâmetro total (colônia+halo) pelo diâmetro das colônias (BERTOLINI, 1987; ROUMAS, 1988; FURLANETO, 1989; VALADARES, 1989). No entanto, para melhor expressar a capacidade de degradação dos fungos, avaliou-se a área total degradada, obtida pela diferença entre a área total de degradação e a área de crescimento da colônia, de acordo com a fórmula do item 3.7, sugerida por FERNANDES, 1987. Tal procedimento forneceu uma estimativa mais precisa em relação ao índice enzimático, considerando que uma colônia de tamanho maior pode produzir, mesmo que a largura de seu halo seja menor, maior área degradada de celulose, em relação a uma colônia menor, que expresse um halo considerável.

MANDELS (1975) e MONTENECOURT & EVELEIGH (1977a) trabalhando com mutante QM9414 e a linhagem selvagem QM6a de *Trichoderma reesei* demonstraram a correlação positiva que existe entre a formação de halo de degradação em placa e a atividade enzimática dessas linhagens, indicando assim a validade do uso de técnicas semi-quantitativas para medir a

FERNANDES, J.S.C., 1987. Comunicação pessoal.

atividade celulolítica. Tal correlação também foi efetiva para *Humicola* sp (ROUMAS, 1988), e isolados selvagens de fungos filamentosos (BERTOLINI, 1987), quando avaliados bioquimicamente.

Sendo assim, este ensaio foi adotado como um critério de seleção. Entre os 115 isolados de fungos obtidos, 12 foram selecionados quanto à produção de halo em meio contendo celulose ácida, descrito a seguir.

Na primeira seleção foram analisados 33 fungos isolados na coleta nº 1. Entre esses, somente nove produziram halo. A Tabela 1, apresenta a análise de variância deste experimento. De acordo com a Tabela 2, foram selecionados quatro isolados considerados superiores ou que não diferiram estatisticamente da linhagem *T. reesei* QM9414.

Tabela 1. Análise de variância da produção de halo dos isolados obtidos na coleta nº 1

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor de F.	C.V.
Isolados	8	122487,37	37,43**	28,33%
Resíduo	45	3272,39		

** Existem diferenças significativas entre tratamentos ao nível de 1% de probabilidade.

G.L., grau de liberdade; Q.M. quadrado médio; F, teste estatístico utilizado; C.V. Coeficiente de variação.

Tabela 2. Teste Tukey para médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção I)

Linhagens	Médias	Contraste
FC ₁	418,48	a
FC ₅	329,21	ab
FC ₃	293,22	b
FC ₁₃	283,79	b
QM9414	250,74	b
FC ₂₃	92,15	c
FC ₈	76,44	c
FC ₁₆	49,38	c
FC ₁₅	23,79	c

* Médias de 6 repetições

** As médias seguidas por letras distintas não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na segunda seleção foram analisados 32 isolados dos quais 25 expressaram halo em celulose ácida. De acordo com a Tabela 4, foram selecionados quatro isolados, entre estes somente o isolado FC₃₇ era superior estatisticamente à linhagem QM9414 quanto a produção de halo. A análise de variância deste experimento encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância da produção de halo dos isolados obtidos na coleta nº 2

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F.	C.V.
Tratamento	24	33,77	14,2**	10%
Resíduo	125	2,37		

** Existem diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 4. Teste Tukey para as médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção II)

Linhagens	Médias	Contraste
FC37	107,403	a
FC35	48,56	b
FC59	34,98	bc
FC53	34,00	bc
QM9414	33,80	bc
FC39	27,58	bc
FC38	17,96	bc
FC58	14,85	bc
FC49	12,86	bc
FC50	9,94	bc
FC55	6,80	c
FC57	6,02	c
FC51	4,90	c
FC47	3,40	c
FC54	2,94	c
FC45	1,047	c
FC56	0,78	c
FC41	0,27	c
FC60	0,26	c
FC43	0,26	c
FC40	0,26	c
FC42	0,25	c
FC48	0,24	c
FC62	0,24	c
FC61	0,24	c

* Média de 6 repetições

** As médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na terceira seleção foram analisados 32 isolados, sendo que destes, somente 8 apresentaram halo de degradação em placa. Pelo teste Tukey de acordo com a Tabela 6, cinco isolados apresentaram médias que não diferiram estatisticamente da linhagem QM9414. No entanto, foram selecionados os isolados FC₈₈ e FC₇₇, por apresentarem as maiores áreas de degradação. De acordo com a análise de variância, Tabela 5, foi observado um coeficiente de variação elevado, 50,84%, embora tenha sido possível detectar diferenças entre os tratamentos ao nível de 5% e 1% através do teste F. A causa da elevação do coeficiente de variação pode estar relacionada com a própria natureza dos isolados utilizados, os quais são fungos selvagens (originados de cultivos não purificados geneticamente). Para se obter um experimento mais preciso, faz-se necessário estudar cada isolado, utilizando colônias monospóricas, visando detectar a existência de variabilidade dentro da linhagem. VALADARES (1989), utilizou tal procedimento no estudo da produção de enzimas por *Metharizium anisopliae*.

Tabela 5. Análise de variância da produção de halos dos isolados obtidos na coleta nº 3

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor de F	C.V.
Tratamento	7	27797,38	12,9**	50,84%
Resíduo	40	2162,233		

** Existem diferenças significativas à nível de 1% de probabilidade.

Tabela 6. Teste Tukey para médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção III)

Linhagem	Média	Contraste
FC ₈₈	232,11	a
FC ₇₇	153,97	ab
FC ₈₇	84,95	bc
FC ₅₈	79,03	bc
FC ₉₁	49,41	c
FC ₇₉	46,33	c
QM ₉₄₁₄	46,23	c
FC ₇₈	39,56	c

* Médias de 6 repetições

** As médias seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na quarta seleção foram analisados 21 isolados, dos quais somente 8 expressaram halos significativos. Na Tabela 8, verifica-se que os isolados FC₁₀₂, FC₁₁₃, FC₉₇, embora diferindo estatisticamente da linhagem QM9414, apresentam médias superiores, no entanto foram selecionados isolados 102 e 113 pois além de apresentarem maior área de degradação estes são termofílicos facultativos e tiveram maior média de crescimento em meio mineral (Tabela 20 do Apêndice).

Tabela 7. Análise de variância da produção de halo dos isolados na coleta nº 4

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor de F	C.V.
Tratamento	7	2.008,15	257,79**	7,05
Resíduo	16	7,79		

** Existem diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 8. Teste Tukey para médias de áreas de degradação de celulose ácida de cada isolado (Seleção IV)

Linhagem	Média	Contraste
QM9414	90,82	a
FC ₁₀₂	59,65	b
FC ₁₁₃	46,52	c
FC ₉₇	41,13	c
FC ₁₁₂	22,75	d
FC ₁₁₄	21,40	d
FC ₁₁₅	18,22	d
FC ₁₁₀	16,41	d

* Médias de 6 repetições.

** Médias seguidas por letras distintas apresentam diferenças significativas ao nível de 5%.

4.4. Caracterização das linhagens selecionadas

4.4.1. Obtenção de isolados monospóricos

Os doze isolados selecionados foram caracterizados como linhagens a partir da obtenção de colônias monospóricas. Geneticamente um isolado poderá ser considerado linhagem quando proveniente de esporos individuais e uninucleados (PIZZIRANI-KLEINER, 1989). No entanto, os isolados do presente trabalho foram considerados linhagens, devido ao fato de terem sido purificados através de cultivo monospórico, apesar de alguns apresentarem variações no número de núcleos nos esporos.

Figura 5. Linhagens obtidas a partir de cultura monospórica dos isolados selecionados

Os números de 1 a 12 correspondem aos isolados identificados na Tabela 9.

Tabela 9. Classificação das linhagens selecionadas produtoras de celulasas

Obtenção	nº de linhagens	Nomenclatura	Classificação
Seleção I	1	FC ₁	<i>Aspergillus parasiticus</i> var. Speare
	2	FC ₃	<i>Aspergillus flavus</i> var. Link
	3	FC ₅	<i>Aspergillus flavus</i> var. Link
	4	FC ₁₃	<i>Aspergillus parasiticus</i> var. Spereare
Seleção II	5	FC ₃₅	<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex. S.F. Gray
	6	FC ₃₇	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> var. Rifai
	7	FC ₅₃	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) App & WR.
	8	FC ₅₉	<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex. S.F. Gray
Seleção III	9	FC ₇₇	<i>Aspergillus fumigatus</i> var. Fresenius
	10	FC ₈₈	<i>Aspergillus fumigatus</i> var. Fresenius
Seleção IV	11	FC ₁₀₂	<i>Aspergillus fumigatus</i> var. Fresenius
	12	FC ₁₁₃	<i>Penicillium fellutanum</i> var. Biourge

4.4.2. Classificação das linhagens

As linhagens foram classificadas na Universidade Federal de Pernambuco, de acordo com o item 3.8.2 da metodologia.

Todos os gêneros encontrados, descritos na Tabela 9, tem sido relatados produtores de celulasas (COUGHLAN, 1985). Entre esses, a espécie *Fusarium solani* tem sido considerada viável para a exploração comercial (WOOD & McCRAE, 1979; McHALE & COUGHLAN, 1980). Segundo DREW & KADAM, 1979, algumas linhagens de *Aspergillus fumigatus* apresentam um complexo enzimático efetivo na conversão de materiais lignocelulósicos. Linhagens de *A. flavus* também tem sido identificadas como produtoras de ligninases (BETTS & DART, 1988), sendo identificadas nesta espécie, enzimas envolvidas na degradação de compostos lignocelulósicos.

4.4.3. Caracterização citológica das linhagens

As linhagens foram caracterizadas citologicamente pela técnica de coloração de núcleos, estimando o número de núcleos por esporo (item 3.8.3). Foram analisados 300 conídios por linhagens, cujos resultados se encontram na Tabela 10. Somente as linhagens FC₃₇ e FC₅₃, apresentaram conídios 100% uninucleados. A obtenção de linhagens com esporos uninucleados constitui um material propício para futuros estudos genéticos, uma vez que a obtenção e seleção de mutantes é facilitada a partir de conídios uninucleados.

Tabela 10. Frequência de núcleos por conídios das linhagens estudadas

Linhagens	% de núcleos por conídios				
	uni	bi	tri	tetra	multinucleados
FC ₁	29,6	56,4	13,0	1,0	-
FC ₃	65,0	32,7	-	-	-
FC ₅	63,8	34,2	2,0	-	-
FC ₁₃	70,6	29,0	0,4	-	-
FC ₃₅	85,0	15,0	-	-	-
FC ₃₇	100,0	-	-	-	-
FC ₅₃	100,0	-	-	-	-
FC ₅₉	98,2	1,8	-	-	-
FC ₇₇	89,9	10,1	-	-	-
FC ₈₈	79,0	21,0	-	-	-
FC ₁₀₂	92,0	8,0	-	-	-
FC ₁₁₃	86,7	13,3	-	-	-

De acordo com a Figura 6, podemos observar que apesar de algumas linhagens terem sido classificadas como pertencentes a mesma espécie e variedade, estas apresentam conídios com características morfológicas diferentes.

Figura 6. Características conidiais das linhagens selecionadas

Fig. 6 (Legenda)

- (1,2,3,4) - correspondem respectivamente, aos conídios das linhagens FC₁, FC₃, FC₅, FC₁₃.
Conídios redondos grandes e intensa esporulação.
- (5, 8) - linhagens FC₃₅ e FC₅₉ respectivamente. Apresentam diferenças morfológicas evidentes, a linhagem FC₅₉ com conídios ovais e vacuolados e intensa esporulação e FC₃₅ com conídios levemente ovais não vacuolados e menores.
- (6) - FC₃₇ - Conídios ovais, vacuolados e uninucleados.
- (7) - FC₅₃ - Macro e Micro conídios uninucleados. Núcleos acentuados, intensa esporulação.
- (9,10,11) - FC₇₇, FC₈₈, FC₁₀₂ respectivamente. Conídios arredondados, com pequenas alterações morfológicas nestes, entre as linhagens. Intensa esporulação. A seta indica esporos agregados em FC₁₀₂.
- (12) - FC₁₁₃ - Conídios arredondados, intensa esporulação de forma agregada.

Ainda pela Figura 6, observou-se que as espécies do gênero *Aspergillus* encontradas podem ser divididas em dois grupos, quanto as características morfológicas de seus conídios. Um grupo incluindo *A. flavus* e *A. parasiticus* (1, 2, 3, 4) e outro os isolados de *A. fumigatus* (9, 10, 11).

4.4.4. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo

Em estudos de isolamento e seleção de microrganismos visam do futuros estudos genéticos é importante o estabelecimento do crescimento em meios definidos. A Tabela 11 apresenta os resultados do crescimento das linhagens em meio completo, meio mínimo e BDA. Todas as linhagens apresentaram crescimento e esporulação nos meios utilizados.

Tabela 11. Avaliação do crescimento das linhagens celulolíticas nos diferentes meios de cultivo, utilizando o diâmetro médio de três repetições (em mm)

Linhagens	Meios		
	BDA	MC	M.M.
FC ₁	74,5	60,0	15,0
FC ₃	77,0	87,0	80,0
FC ₅	75,5	87,0	45,0
FC ₁₃	79,5	87,0	73,0
FC ₃₅	87,0	87,0	87,0
FC ₃₇	87,0	87,0	87,0
FC ₅₃	77,5	86,0	83,5
FC ₅₉	87,0	82,3	55,0
FC ₇₇	87,0	87,0	87,0
FC ₈₈	87,0	87,0	67,5
FC ₁₀₂	82,0	87,0	50,0
FC ₁₁₅	53,5	70,0	35,5

4.4.5. Crescimento e esporulação em diferentes valores de pH

A avaliação do crescimento das linhagens, obtidas na seleção I, em meio completo e mineral nos diferentes pH e períodos encontram-se nas Tabelas 12 e 16. As análises de variância, Tabelas 13 e 17, mostram que houve interação entre horas, linhagens e pH. As Tabelas 14 e 18 apresentam os testes de comparação de médias para cada linhagem nos diferentes pHs. Embora tenha ocorrido uma superioridade das médias de crescimento das linhagens para os pHs mais baixos nos dois meios analisados, verificou-se que em meio mineral contendo celulose como fonte de carbono, as diferenças de crescimento nos períodos avaliados, foram mais acentuadas entre os pHs, evidenciando assim, uma correlação entre pH e meio, ou seja, em determinado meio de cultivo a influência do pH no crescimento do fungo foi maior.

Quanto a esporulação de acordo com as Tabelas 15 e 19, observou-se que em meio completo a esporulação numericamente não apresenta grandes diferenças na faixa de pH testada, enquanto que em meio mineral nos pH mais baixos a esporulação foi maior.

Tabela 12. Crescimento de linhagens obtidas na seleção I, nos diferentes pH em meio completo (os dados constituem a média de três repetições)

Horas	Linhagens	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
24	FC ₁	10,7	12,3	14,0	11,3	11,5	10,3	11,0
	FC ₃	12,7	9,8	12,2	11,7	11,2	11,8	11,8
	FC ₅	14,8	14,7	15,2	15,0	13,7	13,2	14,3
	FC ₁₃	8,2	9,0	8,8	9,7	8,2	8,3	7,8
48	FC ₁	25,8	23,5	27,5	26,2	26,0	26,3	26,3
	FC ₃	30,2	28,7	27,8	27,0	27,5	26,5	26,3
	FC ₅	32,7	33,3	31,7	34,0	31,5	30,5	29,8
	FC ₁₃	17,8	18,0	17,5	18,2	17,5	17,7	16,0
72	FC ₁	40,2	42,0	41,2	40,0	39,2	38,7	39,2
	FC ₃	44,0	42,0	41,2	40,3	40,0	39,8	39,5
	FC ₅	49,3	50,3	49,2	49,5	45,7	46,0	45,5
	FC ₁₃	25,8	26,7	25,0	26,3	31,2	25,5	24,2
96	FC ₁	55,2	56,8	56,7	54,8	54,2	54,2	54,3
	FC ₃	58,3	57,8	57,2	55,5	54,0	54,0	54,3
	FC ₅	67,0	67,7	67,8	67,0	65,5	65,5	62,2
	FC ₁₃	36,3	36,9	35,3	35,3	33,7	33,7	33,2

Tabela 13. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio completo, referente as linhagens obtidas na Seleção I

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	26347,92	10823,26*	4,82
pH/FC ₁	6	7,99	3,28*	
pH/FC ₃	6	20,37	8,37*	
pH/FC ₅	6	24,57	10,09*	
pH/FC ₁₃	6	10,60	4,36*	
pH/(Linh)	24	15,88	6,52*	
Linhagem	3	4828,91	1983,63*	
Hora x Lin. x pH	54	3,66	1,51*	
Resíduo	224	2,43		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 14. Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₁	6,0	34,83	a	A
	5,5	33,67	ab	AB
	6,5	33,08	ab	AB
	5,0	32,96	ab	AB
	6,8	32,74	b	AB
	7,5	32,71	b	AB
	7,0	32,43	b	B
FC ₃	5,0	36,29	a	A
	5,5	35,46	ab	AB
	6,0	34,58	abc	ABC
	6,5	33,62	bc	BC
	6,8	33,17	c	C
	7,0	33,08	c	C
	7,5	33,00	c	C
FC ₅	5,5	41,50	a	A
	6,5	41,33	a	A
	6,0	40,96	ab	AB
	5,0	40,96	ab	AB
	6,8	39,08	bc	BC
	7,0	38,79	c	BC
	7,5	37,96	c	C
FC ₁₃	6,8	23,14	a	A
	5,5	22,62	a	A
	6,5	22,37	a	AB
	5,0	22,08	ab	AB
	6,0	21,67	ab	AB
	7,0	21,32	ab	AB
	7,5	20,29	b	B

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

DMS 1% = 2,20

DMS 5% = 1,88

Tabela 15. Avaliação do melhor pH para esporulação em meio completo (seleção I)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₁	$2,46 \cdot 10^7$	$2,96 \cdot 10^7$	$3,45 \cdot 10^7$	$4,32 \cdot 10^7$	$4,77 \cdot 10^7$	$3,74 \cdot 10^7$	$3,70 \cdot 10^7$
FC ₃	$5,52 \cdot 10^7$	$6,56 \cdot 10^7$	$3,24 \cdot 10^7$	$3,98 \cdot 10^7$	$3,38 \cdot 10^7$	$2,19 \cdot 10^7$	$2,30 \cdot 10^7$
FC ₅	$3,03 \cdot 10^7$	$2,98 \cdot 10^7$	$2,29 \cdot 10^7$	$3,43 \cdot 10^7$	$2,83 \cdot 10^7$	$2,80 \cdot 10^7$	$2,72 \cdot 10^7$
FC ₁₃	$4,44 \cdot 10^7$	$5,17 \cdot 10^7$	$4,40 \cdot 10^7$	$3,48 \cdot 10^7$	$3,13 \cdot 10^7$	$2,58 \cdot 10^7$	$2,49 \cdot 10^7$

Tabela 16. Crescimento nos diferentes pH em meio mineral utilizando o diâmetro médio de três repetições (em mm). Seleção I

Horas	Linhagens	pH						
		5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
24	FC ₁	3,3	5,6	5,0	6,83	5,83	5,3	3,3
	FC ₃	3,0	4,3	5,6	6,8	5,6	5	5,6
	FC ₅	5,3	5,3	6,3	5,6	7,0	4,3	3,3
	FC ₁₃	5,6	4,6	4,83	6,0	5,0	4,0	4,0
48	FC ₁	20,16	19,6	19,0	19,5	16,5	16,3	14,83
	FC ₃	19,5	20,5	19,5	18,6	15,2	17,0	14,3
	FC ₅	20,2	21,8	19,2	16,8	20,3	15,6	14,3
	FC ₁₃	16,3	15,0	13,3	13,2	12,6	12,5	8,0
72	FC ₁	31,6	30,6	29,6	23,2	25,2	23,2	20,6
	FC ₃	29,3	31,0	27,0	26,5	24,6	22,6	19,6
	FC ₅	29,83	31,16	29,0	27,3	23,6	21,5	20
	FC ₁₃	21,6	22,5	20,16	20,3	18,6	17,5	13,6
96	FC ₁	44,3	42,0	41,2	38,0	35,3	33,3	29,8
	FC ₃	42,0	41,5	39,3	36	35,2	29,0	24,0
	FC ₅	41,5	41,8	38,8	38,3	36,0	29,0	27,3
	FC ₁₃	31,6	30,2	29,8	25,8	25,8	23,5	20

Tabela 17. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção I

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	12413,27	6644,77*	6,81%
pH/FC ₁	6	87,44	46,80*	
pH/FC ₃	6	109,74	58,74*	
pH/FC ₅	6	131,56	70,42*	
pH/FC ₁₃	6	74,80	40,02*	
pH/(Linh)	24	100,89	54,00*	
Linhagem	3	642,97	344,18*	
Hora x Lin.x pH	54	4,54	2,43*	
Resíduo	224	1,87		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 18. Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral dos diferentes pH para cada linhagem

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₁	5,0	24,87	a	A
	5,5	24,50	a	A
	6,0	23,70	a	AB
	6,5	21,87	b	BC
	6,8	20,72	bc	CD
	7,0	19,54	c	DE
	7,5	17,66	c	E
FC ₃	5,5	24,33	a	A
	5,0	23,45	ab	AB
	6,0	22,87	ab	AB
	6,5	22,00	b	BC
	6,8	20,16	c	CD
	7,0	18,41	d	D
	7,5	15,91	e	E
FC ₅	5,5	25,04	a	A
	5,0	24,16	ab	A
	6,0	23,29	bc	AB
	6,5	22,04	c	B
	6,8	21,75	c	B
	7,0	17,62	d	C
	7,5	16,25	d	C
FC ₁₃	5,0	18,83	a	A
	5,5	18,08	ab	AB
	6,0	17,04	bc	ABC
	6,5	16,33	c	BC
	6,8	15,54	cd	CD
	7,0	14,37	d	D
	7,5	11,41	e	E

* Média de 3 repetições. - ** Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 1,92

DMS 5% = 1,64

Tabela 19. Avaliação do melhor pH para esporulação em meio mineral contendo celulose cristalina como fonte de carbono (Seleção I)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₁	$7,46 \cdot 10^6$	$1,49 \cdot 10^7$	$1,14 \cdot 10^7$	$8,45 \cdot 10^6$	$7,46 \cdot 10^6$	$7,58 \cdot 10^6$	$7,46 \cdot 10^6$
FC ₃	$1,04 \cdot 10^7$	$1,24 \cdot 10^7$	$8,95 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^6$	$5,96 \cdot 10^6$	$4,97 \cdot 10^6$	$4,97 \cdot 10^6$
FC ₅	$6,96 \cdot 10^6$	$8,95 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^6$	$5,96 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^6$	$5,96 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^6$
FC ₁₃	$5,96 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^6$	$3,98 \cdot 10^6$	$4,47 \cdot 10^6$	$3,48 \cdot 10^6$	$3,48 \cdot 10^6$	$3,47 \cdot 10^6$

Para as linhagens da seleção II, as médias de crescimento nos meios completo e mineral em diferentes pH nos períodos analisados, encontram-se nas Tabelas 20 e 24. Através da análise de variância, Tabelas 21 e 25, verificou-se que houve diferenças significativas entre os tratamentos citados. Pelo teste Tukey, Tabelas 22 e 26, detectou-se diferenças em relação ao pH para o crescimento nos meios analisados. No meio mineral as diferenças entre as médias do crescimento dos fungos dentro de cada período, foram mais acentuadas, indicando uma maior influência do pH neste meio em relação ao crescimento das linhagens. Pode-se observar também que as linhagens FC₃₅ e FC₅₉ apresentaram em termos numéricos (Tabelas 20 e 24) um menor crescimento em meio mineral em relação ao meio completo. Enquanto que nas linhagens FC₅₃ e FC₃₇ isto não ocorreu. Quanto a esporulação de acordo com as Tabelas 23 e 27 verificou-se que as maiores esporulações ocorrem nos pHs considerados os melhores para o crescimento. Além disto observou-se que em meio completo ocorre uma maior esporulação.

Através da análise de variância, Tabelas 29, 33, 37 e 41, verificou-se diferenças entre tratamentos envolvendo as linhagens das seleções III e IV, sendo que pelo teste Tukey, observou-se que em meio mineral os pHs menores proporcionaram um maior crescimento, comparado ao meio completo. Em relação a esporulação verificou-se uma maior taxa de produção de esporos para os pHs menores. Na maioria das linhagens não houve diferenças numéricas de esporulação nos dois meios analisados, com exceção da linhagem FC₁₀₂ que apresentou maior esporulação em meio mineral (Tabelas 31, 35, 39 e 43).

Tabela 20. Crescimento de linhagens obtidas na seleção II nos diferentes pH em meio completo. (Os dados constituem a média de três repetições em mm)

Horas		5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
Linhagens								
24	FC ₃₅	18,5	19,5	17,8	14,7	15,5	13,2	13,5
	FC ₃₇	31,7	30,8	25,0	20,8	19,8	19,7	17,2
	FC ₅₃	10,0	11,5	11,5	12,3	11,2	11,7	11,3
	FC ₅₉	20,0	21,2	25,0	21,7	22,0	16,3	15,3
48	FC ₃₅	59,7	60,2	53,3	47,2	45,3	41,3	57,7
	FC ₃₇	66,8	69,0	57,7	48,0	45,8	43,0	37,5
	FC ₅₃	25,0	26,0	25,7	25,7	26,0	24,5	26,5
	FC ₅₉	61,3	61,8	56,7	50,5	49,2	40,5	41,2
72	FC ₃₅	87,0	87,0	83,8	79,7	75,3	71,2	65,2
	FC ₃₇	87,0	87,0	87,0	87,0	75,0	78,5	69,7
	FC ₅₃	34,0	36,0	36,0	38,2	35,8	37,8	36,8
	FC ₅₉	87,0	87,0	87,0	80,3	74,3	69,5	65,2
96	FC ₃₅	87,0	87,0	87,0	87,0	87,0	87,0	87,0
	FC ₃₇	87,0	87,0	87,0	87,0	87,0	85,7	76,5
	FC ₅₃	45,5	48,3	50,7	50,3	66,5	52,7	52,7
	FC ₅₉	87,0	87,0	87,0	87,0	87,0	87,0	83,8

Tabela 21. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio completo, referente as linhagens obtidas na Seleção II

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	60417,82	3105,58*	8,41%
pH/FC ₃₅	6	187,05	9,61*	
pH/FC ₃₇	6	535,28	27,51*	
pH/FC ₅₃	6	42,17	2,17*	
pH/FC ₅₉	6	332,93	17,11*	
pH/(Linh)	24	274,36	14,10*	
Linhagem	3	16571,16	851,79*	
Hora x Lin.x pH	54	29,44	1,51*	
Resíduo	224	19,45		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 22. Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem (seleção II)

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₃₅	5,5	63,42	a	A
	5,0	63,04	a	AB
	6,0	50,50	ab	ABC
	6,5	57,12	bc	BCD
	7,5	55,83	bc	CD
	6,8	55,79	bc	CD
	7,0	53,17	c	D
FC ₃₇	5,5	68,46	a	A
	5,0	68,12	a	A
	6,0	64,17	ab	AB
	6,5	60,71	bc	BC
	6,8	56,92	c	C
	7,0	56,71	c	C
	7,5	50,21	d	D
FC ₅₃	6,8	34,87	a	A
	7,5	31,83	ab	AB
	7,0	31,67	ab	AB
	6,5	31,62	ab	AB
	6,0	31,04	ab	AB
	5,5	30,46	ab	AB
	5,0	28,62	b	B
FC ₅₉	5,5	64,25	a	A
	6,0	63,92	a	A
	5,0	63,83	a	A
	6,5	59,87	ab	A
	6,8	58,12	bc	AB
	7,0	53,33	cd	BC
	7,5	51,37	d	C

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 6,21

DMS 5% = 5,31

Tabela 23. Avaliação do melhor pH para esporulação em meio completo (Seleção II)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₃₅	$3,76 \cdot 10^8$	$3,42 \cdot 10^8$	$2,35 \cdot 10^8$	$1,09 \cdot 10^8$	$1,66 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^8$	$1,62 \cdot 10^8$
FC ₃₇	$1,55 \cdot 10^8$	$9,07 \cdot 10^7$	$1,60 \cdot 10^7$	$1,35 \cdot 10^7$	$1,51 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^7$	$1,07 \cdot 10^7$
FC ₅₃	$4,88 \cdot 10^8$	$4,94 \cdot 10^8$	$3,82 \cdot 10^8$	$4,01 \cdot 10^8$	$3,77 \cdot 10^8$	$3,83 \cdot 10^8$	$3,76 \cdot 10^8$
FC ₅₉	$1,01 \cdot 10^8$	$8,40 \cdot 10^7$	$9,51 \cdot 10^7$	$8,89 \cdot 10^7$	$1,01 \cdot 10^8$	$1,12 \cdot 10^8$	$1,06 \cdot 10^8$

Tabela 24. Crescimento de linhagens obtidas na seleção II nos diferentes pH em meio mineral (os dados constituem a média de três repetições em mm)

Horas		5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
	Linhagens							
24	FC ₃₅	1,0	1,0	6,0	12,7	8,7	1,0	1,0
	FC ₃₇	37,7	40,0	37,3	40,0	35,3	32,0	32,7
	FC ₅₃	35,0	37,3	33,0	37,0	29,3	19,7	14,7
	FC ₅₉	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
48	FC ₃₅	6,0	3,5	7,4	14,5	10,5	4,2	3,8
	FC ₃₇	68,3	57,3	50,3	46,0	31,3	18,3	16,7
	FC ₅₃	37,7	43,3	37,3	40,0	35,3	32,0	27,3
	FC ₅₉	20,0	23,0	17,3	15,0	14,0	18,7	16,0
72	FC ₃₅	7,8	4,5	8,8	20,0	13,0	28,7	4,6
	FC ₃₇	87,0	87,0	70,7	63,0	43,0	35,3	25,3
	FC ₅₃	49,7	47,0	70,7	45,3	46,3	38,3	35,3
	FC ₅₉	20,7	25,0	22,3	20,5	18,8	22,3	20,7
96	FC ₃₅	19,5	16,8	21,8	28,0	26,2	18,3	16,2
	FC ₃₇	87,0	87,0	87,0	87,0	69,3	44,3	35,3
	FC ₅₃	52,3	53,0	61,7	55,0	57,7	58,0	49,0
	FC ₅₉	39,0	40,3	36,0	32,3	30,3	30,3	28,3

Tabela 25. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção II

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	11841,41	578,88*	14,63%
pH/FC ₃₅	6	248,97	12,17*	
pH/FC ₃₇	6	3487,40	170,48*	
pH/FC ₅₃	6	453,69	22,18*	
pH/FC ₅₉	6	59,60	2,91*	
pH/(Linh)	24	1062,42	51,94*	
Linhagem	3	30886,49	1509,92*	
Hora x Lin.x pH	54	142,55	6,97*	
Resíduo	224	20,46		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 26. Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral nos diferentes pH para cada linhagem (seleção II)

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₃₅	6,5	18,79	a	A
	6,8	14,54	ab	AB
	7,0	13,04	bc	AB
	6,0	11,02	bcd	BC
	5,0	8,58	cd	BC
	5,5	6,46	d	C
	7,5	6,41	d	C
FC ₃₇	5,0	70,00	a	A
	5,5	67,83	a	A
	6,0	61,33	b	B
	6,5	59,00	b	B
	6,8	44,75	c	C
	7,0	32,50	d	D
	7,5	27,50	d	D
FC ₅₃	6,0	50,67	a	
	5,5	45,17	b	
	6,5	44,33	b	
	5,0	43,67	b	
	6,8	42,17	bc	
	7,0	37,00	cd	
	7,5	31,58	d	
FC ₅₉	5,5	22,33	a	A
	5,0	20,17	ab	A
	6,0	19,17	ab	A
	7,0	18,08	ab	A
	6,5	17,21	ab	A
	7,5	16,50	b	A
	6,8	16,04	b	A

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

DMS 1% = 6,36

DMS 5% = 5,44

Tabela 27. Avaliação do melhor pH para a esporulação em meio mineral (Seleção II)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₃₅	$5,58 \cdot 10^5$	$8,57 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^6$	$2,39 \cdot 10^6$	$1,44 \cdot 10^6$	$4,94 \cdot 10^5$	$5,58 \cdot 10^5$
FC ₃₇	$7,22 \cdot 10^6$	$7,25 \cdot 10^6$	$8,48 \cdot 10^6$	$6,28 \cdot 10^6$	$5,61 \cdot 10^6$	$2,27 \cdot 10^6$	$1,71 \cdot 10^5$
FC ₅₃	$3,36 \cdot 10^5$	$3,78 \cdot 10^5$	$3,14 \cdot 10^6$	$2,77 \cdot 10^6$	$2,47 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$3,02 \cdot 10^6$
FC ₅₉	$1,04 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^7$	$7,38 \cdot 10^6$	$6,95 \cdot 10^6$	$6,23 \cdot 10^6$	$6,12 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^6$

Tabela 28. Crescimento de linhagens obtidas na seleção III nos diferentes pH em meio completo (os dados constituem a média de três repetições em mm)

Horas	Linhagens	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
24	FC ₇₇	19,2	17,3	17,2	16,7	18,3	17,8	34,8
	FC ₈₈	15,0	13,7	13,3	12,8	14,0	12,5	13,3
48	FC ₇₇	40,3	42,7	38,0	35,0	35,0	39,7	38,2
	FC ₈₈	30,2	29,5	27,3	35,2	30,2	29,3	22,7
72	FC ₇₇	65,7	63,8	60,0	54,0	49,3	59,3	56,0
	FC ₈₈	53,0	60,3	55,3	67,0	58,7	50,0	54,0
96	FC ₇₇	87,0	83,3	84,3	80,0	79,3	74,3	74,3
	FC ₈₈	64,0	64,0	65,3	76,7	73,0	62,0	70,3

Tabela 29. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio completo, referente as linhagens obtidas na Seleção III

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	26940,40	1005,94*	11,35%
pH/FC ₇₇	6	95,83	3,58*	
pH/FC ₈₈	6	119,76	4,47*	
pH/(Linh)	12	107,80	4,02*	
Linhagem	1	2395,15	86,82*	
Hora x Lin. x pH	18	57,08	2,13*	
Resíduo	112	26,78		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 30. Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem (seleção III)

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₇₇	5,0	53,04	a	A
	5,5	51,79	ab	AB
	7,5	50,83	ab	AB
	6,0	49,87	ab	AB
	7,0	47,79	ab	AB
	6,5	46,42	b	AB
	6,8	45,50	b	B
FC ₈₈	6,5	47,92	a	A
	6,8	43,96	ab	AB
	5,5	41,87	ab	AB
	5,0	40,54	b	AB
	6,0	40,33	b	B
	7,5	40,08	b	B
	7,0	38,46	b	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 7,41

DMS 5% = 6,30

Tabela 31. Avaliação do melhor pH para esporulação em meio completo (seleção III)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,5	7,0	7,5
FC ₇₇	$1,01 \cdot 10^8$	$1,25 \cdot 10^8$	$6,9 \cdot 10^7$	$4,19 \cdot 10^7$	$3,65 \cdot 10^7$	$1,16 \cdot 10^7$	$4,43 \cdot 10^6$
F ₈₈	$4,07 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$1,07 \cdot 10^7$	$1,09 \cdot 10^7$	$8,06 \cdot 10^6$	$9,02 \cdot 10^6$

Tabela 32. Crescimento de linhagens obtidas na seleção III nos diferentes pH em meio mineral (os dados constituem a média de três repetições em mm)

Horas	Linhagens	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
24	FC ₈₈	12,2	11,8	9,8	10,3	9,3	8,8	7,8
	FC ₇₇	14,5	12,8	15,2	15,0	15,2	13,8	12,8
48	FC ₈₈	24,2	24,2	22,5	22,3	23,2	20,8	16,1
	FC ₇₇	37,5	35,2	29,3	37,1	27,8	25,8	14,0
72	FC ₈₈	36,2	36,2	34,7	36,1	35,8	24,0	22,3
	FC ₇₇	49,7	46,7	42,1	33,7	31,4	28,7	25,2
96	FC ₈₈	48,3	45,5	48,5	38,5	40,8	36,5	24,8
	FC ₇₇	52,2	50,5	55,2	44,7	45,3	38,8	37,5

Tabela 33. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção III

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	7455,06	3091,69*	5,37%
pH/FC ₈₈	6	239,20	99,20*	
pH/FC ₇₇	6	391,35	162,30*	
pH/(Linh)	12	315,28	130,75*	
Linhagem	1	1302,04	539,97*	
Hora x Lin. x pH	18	38,42	15,93*	
Resíduo	112	2,41		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 34. Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral nos diferentes pH para cada linhagem (seleção III)

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₈₈	5,0	30,21	a	A
	5,5	29,42	a	AB
	6,0	28,87	ab	ABC
	6,8	27,29	bc	BC
	6,5	26,81	c	C
	7,0	22,54	d	D
	7,5	17,77	e	E
FC ₇₇	5,0	38,46	a	A
	5,5	36,29	b	AB
	6,0	35,43	b	B
	6,5	32,60	c	C
	6,8	29,93	d	D
	7,0	26,79	e	E
	7,5	22,37	f	F

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 2,22

DMS 5% = 1,89

Tabela 35. Avaliação do melhor pH para esporulação em meio mineral (seleção III)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₈₈	$2,93 \cdot 10^7$	$2,13 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^6$	$1,14 \cdot 10^7$	$4,56 \cdot 10^7$	$4,55 \cdot 10^6$	$2,04 \cdot 10^6$
FC ₇₇	$3,51 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^7$	$1,35 \cdot 10^7$	$1,38 \cdot 10^7$	$1,34 \cdot 10^7$	$2,88 \cdot 10^6$

Tabela 36. Crescimento de linhagens obtidas na seleção IV nos diferentes pH em meio completo (os dados constituem a média de três repetições em mm)

Horas	Linhagens	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
24	FC ₁₀₂	20,2	20,2	20,5	19,5	17,5	16,7	15,3
	FC ₁₁₃	12,2	12,7	10,8	11,2	9,8	9,7	8,7
48	FC ₁₀₂	23,5	23,2	22,7	22,5	19,3	19,0	18,0
	FC ₁₁₃	15,1	15,3	13,7	13,3	12,4	12,5	10,3
72	FC ₁₀₂	35,3	35,8	33,8	32,8	22,2	20,8	20,0
	FC ₁₁₃	18,2	18,3	16,5	15,5	14,3	15,2	13,5
96	FC ₁₀₂	48,0	48,7	46,2	45,7	34,0	32,8	31,7
	FC ₁₁₃	23,5	20,7	19,2	17,7	17,5	17,2	15,5

Tabela 37. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referentes as linhagens obtidas na Seleção IV

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	1704,47	203,34*	13,91%
pH/FC ₁₀₂	6	241,90	28,85*	
pH/FC ₁₁₃	6	41,17	4,91*	
pH/(Linh)	12	141,53	16,88*	
Linhagem	1	6352,94	757,89*	
Hora x Lin.x pH	18	18,91	2,26*	
Resíduo	112	8,38		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 38. Teste Tukey para médias de crescimento em meio completo nos diferentes pH para cada linhagem (seleção IV)

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₁₀₂	5,5	31,95	a	A
	6,0	30,80	a	A
	6,5	30,12	a	A
	5,0	28,91	a	A
	6,8	23,29	b	B
	7,0	22,35	b	B
	7,5	21,25	b	B
FC ₁₁₃	5,0	17,22	a	A
	5,5	16,75	ab	A
	6,0	15,05	abc	AB
	6,5	14,41	abc	AB
	7,0	13,64	bc	AB
	6,8	13,51	bc	AB
	7,5	12,00	c	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 1,73

DMS 5% = 1,47

Tabela 39. Avaliação do melhor pH para a esporulação em meio completo (Seleção IV)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₁₀₂	$4,35 \cdot 10^7$	$5,56 \cdot 10^7$	$1,02 \cdot 10^8$	$9,9 \cdot 10^6$	$4,32 \cdot 10^6$	$5,06 \cdot 10^6$	$2,01 \cdot 10^6$
FC ₁₁₃	$7,35 \cdot 10^6$	$8,9 \cdot 10^6$	$4,31 \cdot 10^5$	$2,87 \cdot 10^5$	$2,62 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$

Tabela 40. Crescimento de linhagens obtidas na seleção IV nos diferentes pH em meio mineral (os dados constituem a média de três repetições em mm)

Horas	Linhagens	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
24	FC ₁₀₂	19,2	20,5	19,8	18,2	18,5	17,8	16,5
	FC ₁₁₃	3,3	3,7	4,7	5,9	5,2	4,5	3,3
48	FC ₁₀₂	21,7	22,8	21,8	19,8	20,2	19,8	18,2
	FC ₁₁₃	16,3	15,0	13,3	13,2	12,7	12,5	8,0
72	FC ₁₀₂	26,8	27,7	26,8	24,7	23,8	22,5	21,0
	FC ₁₁₃	21,7	22,5	20,2	20,3	18,7	17,7	13,7
96	FC ₁₀₂	57,2	55,5	54,2	50,2	49,3	50,5	48,4
	FC ₁₁₃	31,7	30,2	29,8	25,8	25,8	23,7	23,0

Tabela 41. Análise de variância do crescimento em diferentes pH em meio mineral, referente as linhagens obtidas na Seleção IV

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Horas	3	6270,17	4315,56*	5,36%
pH/FC ₁₀₂	6	54,00	37,15*	
pH/FC ₁₁₃	6	55,33	38,08*	
pH/(Linh)	12	54,65	37,62*	
Linhagem	1	7223,35	4971,60*	
Hora x Lin. x pH	18	2,45	1,69ns	
Resíduo	112	1,45		

* Valores significativos ao nível de 5%

ns. não significativo

Tabela 42. Teste Tukey para médias de crescimento em meio mineral nos diferentes pH para cada linhagem (seleção IV)

Linhagens	pH	Médias	5%	1%
FC ₁₀₂	5,5	31,62	a	A
	5,0	31,22	a	A
	6,0	30,67	a	A
	6,5	28,21	b	B
	6,8	27,96	b	B
	7,0	27,67	b	BC
	7,5	26,02	c	C
FC ₁₁₃	5,0	18,25	a	A
	5,5	17,83	a	AB
	6,0	17,00	ab	ABC
	6,5	16,31	b	BCD
	6,8	15,59	bc	CD
	7,0	14,58	c	D
	7,5	12,00	d	E

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 1,73

DMS 5% = 1,47

Tabela 43. Avaliação da esporulação em meio mineral em diferentes pH (Seleção IV)

Linhagens	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	6,8	7,0	7,5
FC ₁₀₂	$9,0 \cdot 10^8$	$8,74 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^8$	$1,27 \cdot 10^8$	$1,03 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^7$	$1,01 \cdot 10^7$
FC ₁₁₃	$8,31 \cdot 10^6$	$9,42 \cdot 10^6$	$6,71 \cdot 10^6$	$4,19 \cdot 10^6$	$3,87 \cdot 10^5$	$2,95 \cdot 10^5$	$2,87 \cdot 10^5$

O fator pH é fundamental para o crescimento e produção de enzimas por fungos. Se o pH do meio não estiver controlado, o crescimento ocorre de forma lenta, inativando conseqüentemente a atividade da enzima (GHOSE & GHOSH, 1979; KNAPP & LEGG, 1986).

De acordo com os dados observados, existe uma faixa ótima de pH para o crescimento de cada linhagem, nos diferentes meios testados. No entanto em meio contendo celulose como fonte de carbono, a faixa ótima de pH para o crescimento dos fungos é menor, pelo menos para a maioria das linhagens, ou seja, neste meio o fator pH foi mais limitante, indicando a importância deste, de acordo com o substrato utilizado. Tais resultados podem estar correlacionados com o observado para *T. reesei* QM9414 (RYU & MANDELS, 1980) e *Aspergillus nidulans* (BAGGA & SANDHU, 1987), onde o pH ótimo para o crescimento difere daquele ótimo para a produção e atividade de celulasas. Além disso, foi verificado que para a maioria das linhagens os pHs mais reduzidos proporcionaram um crescimento maior em meio mineral. Tal fato foi também constatado para *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai* por FURLANETO (1989).

Quanto a esporulação, foi verificado que a melhor faixa de pH para esta característica, coincide com a mesma determinada para o crescimento. Da mesma forma, CASTRO (1982) verificou que o pH 5,5 estabelecido como o ideal para o crescimento, favoreceu a esporulação em *T. reesei*

QM9414. De maneira geral, as linhagens apresentaram boa esporulação em meio completo quando comparadas com outras linhagens celulolíticas domesticadas e já estudadas geneticamente, como *Humicola* sp. (MACEDO, 1986; RODRIGUES, 1987; ROUMAS, 1988); *Aspergillus niger* (GOLDMAN, 1988); *Trichoderma* sp. (CARVALHO, 1989) e *Trichoderma pseudokoningii* (FURLANETO, 1989).

4.4.6. Avaliação do melhor pH para produção de halo em meio contendo celulose ácida

As linhagens selecionadas foram avaliadas quanto a produção de halo de degradação em meio contendo celulose ácida, variando os valores de pH. Através das análises de variância (Tabelas 44, 46, 48 e 50), foram encontrados valores de F significativos ao nível de 5% de probabilidade para os fatores linhagem, pH e interação entre ambos, indicando haver diferenças na produção de halo pelas linhagens de acordo com o pH utilizado. Pelo teste Tukey, (Tabelas 45, 47, 49 e 51) foi verificado que os pHs abaixo de 6,0 favorecem a degradação de celulose ácida na maioria das linhagens, com exceção da FC₅₃ na qual a melhor média de degradação foi obtida em pH 6,0 e esta difere estatisticamente somente das médias obtidas nos pHs 7,5, 5,5, 5,0 e a linhagem FC₇₇ no qual em pH 6,0 foi obtida a maior área de halo de degradação, já na linhagem FC₁₁₃ não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 44. Análise de variância da produção de halos das linhagens, obtidas na seleção I, em diferentes pH

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Linhagem	3	20413,56	89,09*	23,15%
pH/FC ₁	6	14435,31	63,00*	
pH/FC ₃	6	1133,25	4,94*	
pH/FC ₅	6	7566,40	33,02*	
pH/FC ₁₃	6	7006,87	30,58*	
pH/(Lin)	24	7535,46	32,89*	
Resíduo	56	229,109		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 45. Teste Tukey para médias de área de degradação de celulose para cada linhagem nos diferentes pH (seleção I)

Linhagem	pH	Médias	5%	1%
FC ₁	5,5	198,28	a	A
	5,0	158,67	b	AB
	6,0	126,64	b	B
	6,8	73,25	c	C
	7,0	32,96	d	CD
	7,5	29,05	d	CD
	6,5	27,73	d	D
FC ₃	5,5	51,28	a	A
	5,0	48,07	ab	AB
	6,0	15,10	abc	AB
	7,5	13,26	bc	AB
	7,0	11,77	bc	AB
	6,8	6,34	c	AB
	6,5	6,00	c	B
FC ₅	5,0	140,25	a	A
	5,5	127,28	a	A
	6,0	64,62	b	B
	6,8	58,34	bc	BC
	7,0	25,63	cd	BC
	6,5	24,32	cd	BC
	7,5	16,59	d	C
FC ₁₃	5,5	160,38	a	A
	5,0	128,53	a	AB
	6,0	83,64	b	BC
	6,8	75,15	b	CD
	6,5	66,99	bc	CDE
	7,5	31,65	cd	DE
	7,0	28,19	d	E

* Médias de 3 repetições. - ** Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

DMS 1% = 45,05

DMS 5% = 37,80

Tabela 46. Análise de variância da produção de halo das linhagens, obtidas na seleção II, em diferentes pH

Fontes de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Linhagem	3	39888,35	67,49*	17,01%
pH/FC ₃₅	6	19817,73	33,53*	
pH/FC ₃₇	6	34027,79	57,57*	
pH/FC ₅₃	6	8235,69	13,93*	
pH/FC ₅₉	6	19203,03	32,49*	
pH(Linh)	24	20321,06	34,38*	
Resíduo	56	590,97		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 47. Teste Tukey para médias de área de degradação de celulose para cada linhagem (seleção II)

Linhagem	pH	Médias	5%	1%
FC ₃₅	6,5	266,21	a	A
	6,0	206,18	ab	AB
	6,8	204,61	b	AB
	5,0	174,08	b	B
	5,5	150,66	b	B
	7,0	68,29	c	C
	7,5	35,23	c	C
FC ₃₇	5,0	351,77	a	A
	5,5	241,41	b	B
	6,8	238,21	b	B
	6,5	226,96	b	B
	6,0	204,08	b	B
	7,0	73,52	c	C
	7,5	41,32	c	C
FC ₅₃	6,0	185,78	a	A
	6,5	138,51	ab	AB
	7,0	104,66	b	BC
	6,8	96,02	bc	BC
	7,5	84,98	bc	BC
	5,5	40,56	c	C
	5,0	37,93	c	C
FC ₅₉	6,0	222,05	a	A
	5,0	210,57	a	AB
	5,5	142,50	b	BC
	6,5	134,49	b	C
	6,8	44,21	c	D
	7,5	38,72	c	D
	7,0	37,93	c	D

* Médias de 3 repetições. - ** Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicada

DMS 1% = 72,36

DMS 5% = 60,71

Tabela 48. Análise de variância da produção de halo das linhagens obtidas na seleção III, em diferentes pH

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Linhagem	1	1831,88	4,91*	10,77%
pH/FC ₈₈	6	50744,31	136,05*	
pH/FC ₇₇	6	34829,87	93,38*	
pH/(Linh)	12	42787,09	114,71*	
Resíduo	28	372,98		

* Valores significativos ao nível de 5%

Tabela 49. Teste Tukey para médias de área de degradação para cada linhagem (seleção III)

Linhagem	pH	Médias	5%	1%
FC ₈₈	5,5	365,94	a	A
	5,0	295,44	b	B
	6,0	211,08	c	C
	6,5	189,11	c	C
	6,8	79,00	d	D
	7,0	36,76	d	D
	7,5	31,00	d	D
FC ₇₇	6,0	365,23	a	A
	6,5	236,42	b	B
	5,5	235,34	b	B
	5,0	214,02	b	B
	6,8	88,47	c	C
	7,0	86,35	c	C
	7,5	74,95	c	C

* Médias de 3 repetições

** Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 60,73

DMS 5% = 50,02

Tabela 50. Análise de variância da produção de halos das linhagens obtidas na seleção IV, em diferentes pH

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
Linhagens	1	1706,14	33,82*	21.95%
pH/FC ₁₀₂	6	2283,40	45,26*	
pH/FC ₁₁₃	6	98,80	1,95ns	
pH/(Linh)	12	1191,10	23,61	
Resíduo	28	50,44		

* Valor significativo ao nível de 5%

ns. não significativo

Tabela 51. Teste Tukey para médias de áreas de degradação para cada linhagem (seleção IV)

Linhagem	pH	Médias	5%	1%
FC ₁₀₂	5,0	86,80	a	A
	5,5	66,45	b	A
	6,0	38,89	c	B
	6,5	24,13	cd	BC
	7,5	21,71	cd	BC
	7,0	16,67	d	BC
	7,5	16,41	d	C

* Médias de 3 repetições

** Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

DMS 1% = 22,33

DMS 5% = 18,39

Uma enzima apresenta atividade máxima em determinado pH, denominado pH ótimo, onde a proteína no seu ponto isoelétrico apresenta o máximo de atividade catalítica. Tal fato se deve a modificações na molécula da enzima devido a ionização de certos grupos químicos desta. Porém o pH, além de promover modificações na molécula da enzima parece alterar também o próprio substrato, promovendo assim uma maior interação entre enzima e substrato (VILLELA *et alii*, 1976).

Em relação ao complexo celulase, a revisão de KLYOSOV & RABINOWITH (1980), nos relata os valores de velocidade de cada componente do sistema celulase e suas propriedades quanto aos valores de pH e especificidades em relação aos substratos, relatando que pH mais reduzidos favorecem as atividades destes componentes.

A ocorrência de um pH ótimo para produção e atividade de celulase foi observada em alguns gêneros como *Trichoderma* (OKADA, 1976, BERGHEM *et alii*, 1975; STEMBERG, 1976; WOOD & McCRAE, 1978; RYU & MANDELS, 1980; WIDDEN *et alii*, 1989), *Aspergillus* (PARRY *et alii*, 1983; BAGGA & SANDHU, 1987) *Fusarium* (MISHRA *et alii*, 1983) *Penicillium* (WOOD *et alii*, 1980 e RAO *et alii*, 1986).

Sendo assim, o aumento da área de degradação de celulose em pH abaixo de 6,0, observados nos resultados, devem estar provavelmente correlacionados com o pH ótimo para a atividade enzimática, embora outros fatores como crescimento e esporulação estejam envolvidos, como discutidos no item 4.4.5. Além disso, MIRIUVORI *et alii* (1985) relataram que o controle dos valores de pH é fundamental para a secreção de celulasas.

4.4.7. Caracterização eletroforética das linhagens

Entre as linhagens isoladas, foram identificados em alguns casos mais de um representante da mesma espécie e do mesmo gênero. No entanto estas apresentam características morfológicas diferentes, de acordo com o observado para característica de colônias (Figura 5) e conídios (item 4.4.3). Tal fato pode estar relacionado com a existência de uma variabilidade natural dentro da espécie, sendo assim foi escolhido um padrão enzimático para detectar diferenças entre as linhagens selecionadas. Segundo PACCOLA-MEIRELLES *et alii* (1988), os perfis isoenzimáticos permitem detectar diferenças mais sensíveis entre os organismos do que perfis de proteínas totais.

As linhagens selecionadas foram caracterizadas eletroforeticamente quanto ao padrão esterase. A Figura 7, apresenta os padrões α e β esterases das diferentes linhagens de fungo.

De acordo com a Figura 7, pode-se identificar a presença de bandas α e β esterases em todas as linhagens analisadas, caracterizando estas quanto a produção desta enzima. No entanto foram detectadas diferenças quanto ao número e posição das bandas, indicando uma variabilidade entre os gêneros e até mesmo entre as espécies analisadas.

Figura 7. Padrões de α e β estêrases em diferentes linhagens selvagens.

1. *A. parasiticus* (FC₁), 2. *A. flavus* (FC₃), 3. *A. flavus*, (FC₅), 4. *A. parasiticus* (FC₁₃), 5. *T. viride* (FC₃₅), 6. *T. pseudo-koningii* (FC₃₇), 7. *F. solani* (FC₅₃) 8. *T. viride* (FC₅₉), 9. *A. fumigatus* (FC₇₇), 10. *A. fumigatus* (FC₈₈), 11. *A. fumigatus* (FC₁₀₂), 12. *P. fellutanum* (FC₁₁₃).

Em relação ao perfil enzimático, as linhagens do gênero *Aspergillus* podem ser divididas em 2 grupos. As linhagens FC₁, FC₃, FC₅ e FC₁₃ podem ser agrupadas por apresentarem bandas α e β esterases espessas, variando muito pouco quanto ao número e posição destas, com exceção da linhagem FC₃. Além disto foi verificado a existência de um perfil enzimático distinto para FC₃ e FC₅, classificadas como mesma linhagem e variedade. Enquanto que as linhagens FC₇₇, 78 e 102, classificadas como *A. fumigatus* constituiriam um outro grupo pois possuem um perfil característico, apresentando algumas bandas em comum, porém variando no número e posição destas, indicando uma variabilidade natural nesta espécie. Tais resultados condizem com o observado quanto a morfologia dos conídios (Figura 6, item 4.4.3) onde estas linhagens também podem ser divididas em dois grupos.

Nas linhagens FC₃₅ e FC₅₉, pode-se observar um perfil enzimático bem diferenciado, indicando uma variabilidade muito grande, embora tenham sido consideradas mesma espécie e variedade. Tais linhagens possuem características distintas quanto a morfologia de seus conídios e colônias, diferenciando-se a nível de esporulação e crescimento. Segundo MELLO (1989) a existência de uma grande variabilidade natural dentro da espécie *Trichoderma*, dificulta os estudos de taxonomia neste gênero. Sendo assim sugerimos uma reclassificação destas espécies.

MELLO, I.S., 1989. Comunicação pessoal.

Alguns autores tem correlacionado diferenças nos perfis enzimáticos com alterações no material genético ocorrido por mutações, responsáveis pelos padrões com diferentes posições de migrações em linhagens selvagens e mutantes (SILVEIRA, 1983; PACCOLA-MEIRELLES, 1988; GOLDMAN, 1988; VALADARES, 1989; FURLANETTO, 1989). Sendo assim, podemos sugerir a utilização dos perfis de esterases para a detecção de variabilidade natural, uma vez que este padrão possibilitou a obtenção de bandas visíveis e características nas diferentes linhagens estudadas. No entanto, recomendamos a análise de outros perfis enzimáticos para concluir as distâncias genéticas observadas entre os gêneros e as espécies.

4.5. Determinação da atividade celulase

4.5.1. Cultivo em meio semi-sólido

Para a produção de enzimas, tem sido utilizados cultivos em meio líquido e em meio semi-sólido. Meios líquidos para produção de celulases foram desenvolvidos (REESE *et alii*, 1969, PETERSON *et alii*, 1963), os quais consistem de uma fonte de carbono, a celulose, balanceada com alguns requisitos nutricionais que variam quanto às suas concentrações, de acordo com o microrganismo utilizado. JABBAR & IHALI (1985) estudaram a produção de celulase fúngica em cultura semi-sólida comparando-a com cultura submersa e verificaram que a produção de proteínas e enzimas em meio semi-sólido é superior. Segundo VITOLLO (1988), o cultivo em meio semi-sólido, utilizando substratos não específicos, tem apresentado grande eficiência na produção de enzimas microbianas.

Neste trabalho optou-se pelo cultivo semi-sólido utilizando como substrato o farelo de trigo. Segundo YOSHIOKA *et alii* (1982), a natureza deste substrato é apropriada para a obtenção de celulasas. GOLDMAN (1988) relatou a importância deste substrato em fermentações industriais, utilizando-o como condição de cultivo para a extração de celulasas em *Aspergillus niger*. CARVALHO (1989), observou para *Trichoderma* sp uma vantagem na utilização do cultivo semi-sólido quando comparado à cultura líquida, relatando que neste cultivo a produção de enzimas ocorre com menor tempo de fermentação, onde o máximo de produção é obtida em um espaço de tempo menor, sendo quantitativamente igual ou maior que em meio líquido.

4.5.2. Dosagem bioquímica

A determinação da atividade específica de cada componente do complexo enzimático celulase foi feita através de dosagem bioquímica.

Durante as dosagens, observou-se variações quanto a produção entre as repetições, que provavelmente podem ter sido originadas no momento da extração das enzimas, uma vez que as condições, temperatura e pH, considerados ideais para as atividades foram rigorosamente mantidas. Provavelmente, alterações como pH da água utilizada durante a extração poderia ter originado tal variação. Além disto, algumas linhagens que permaneciam estocadas, quando cultivadas em meio completo e, posteriormente, transferidas para o cultivo semi-sólido apresentavam um crescimento lento e em alguns casos, uma baixa atividade enzimática. No entanto, quando cultivadas previamente em meio contendo celulose como fonte de carbono, observou-se que o crescimento e esporulação aumentavam e, conseqüentemente, a atividade enzimática era maior.

Todas as linhagens analisadas demonstraram produzir as atividades exogluconases (avicelase), endogluconase (CMCase) e β -glucosidase (salicinase). A Tabela 52 reúne os resultados das análises de variância das quatro seleções, na qual foi observado interações significativas entre linhagens e produção de enzimas, com exceção da produção de salicinasas para as linhagens da seleção III. De acordo com a Tabela 53, observa-se que as atividades específicas de salicinasas das linhagens FC₁₃, FC₃₅, FC₃₇, FC₅₃, FC₁₀₂ e FC₁₁₃, foram superiores estatisticamente em relação à *T. reesei* QM9414. Porém a linhagem FC₅₃, apresentou-se superior quanto a atividade total, embora não tenha diferido estatisticamente da linhagem QM9414 em relação as atividades Avicelase e CMCase.

O gênero *Trichoderma* tem sido o mais recomendado no processo de sacarificação de materiais celulósicos (HERR, 1979). Por outro lado, este gênero é conhecido por secretar pequenas quantidades de β -glicosidase, enzima que desempenha um papel fundamental na fase final da sacarificação de celulose, ou seja, rompendo as ligações da celobiose e originando glicose. No entanto, STEMBERG *et alii* (1977), conseguiu um aumento na taxa de sacarificação de *Trichoderma* através da suplementação com β -glicosidase produzida por *Aspergillus* sp. CAMPOS & PIETRO, 1986, estabeleceram um esquema de seleção visando obter fungos que excretaram β -glicosidase para o meio. Sendo assim, a busca de linhagens produtoras de β -glicosidase é de fundamental importância. Como por exemplo, GOLDMAN, 1988 verificou uma produção de β -glicosidade superior ao *T. reesei* QM9414 em *Aspergillus niger*. Níveis elevados de β -glicosidade também foram encontrados em *humicola* sp (ARAÚJO, 1983; CHAVES, 1982; MACEDO, 1986; RODRIGUES, 1987;

Tabela 52. Análises de variância da comparação das atividades celulosas das linhagens selecionadas e *T. reesei* QM9414

Seleção	Fonte de variação	G.L.	Q.M.	Valor F	C.V.
I	Enzima	2	196975.35	13.17*	
	Linh/Salicinase	4	325266.73	21.75*	28,21%
	Linh/Avicelase	4	1064030.92	71.16*	
	Linh/CMCase	4	878340.49	58.74*	
	Linh/(Enz)	12	755879.38	50.55*	
	Resíduo	45	14952.57		
II	Enzima	2	44.64	0.04ns	
	Linh/Salicinase	4	49081.35	39.78*	21.15%
	Linh/Avicelase	4	9327.26	7.56*	
	Linh/CMCase	4	15992.88	12.96*	
	Linh/(Enz)	12	24800.50	20.10*	
	Resíduo	45	1233.73		
III	Enzima	2	55571.75	682.45*	
	Linh/Salinase	2	167.49	2.05ns	
	Linh/Avicelase	2	192353.68	2362.21*	4.94%
	Linh/CMCase	2	137627.04	1690.14*	
	Linh/(Enz)	6	110049.41	1351.47*	
	Resíduo	27	81.43		
IV	Enzima	2	218583.04	110.78*	
	Linh/Salinase	2	359205.61	182.05*	
	Linh/Avicelase	2	500784.50	253.80*	10.07%
	Linh/CMCase	2	1016918.14	515.39*	
	Linh/(Enz)	6	625636.08	317.08*	
	Resíduo	27	625636.08	317.08*	

* Existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

ns - não significativo

Tabela 53. Valores médios e significâncias das diferentes atividades enzimáticas relativas à linhagens obtidas na seleção I, II, III, IV

Seleção		Médias das atividades enzimáticas*			Total**
	Linhagens	Salicinasase	Avicelase	CMCase	
I	FC ₁	228.35 B	322.77 B	309.91 B	287.01 B
	FC ₃	203.59 B	102.33 B	178.58 B	161.50 B
	FC ₅	199.92 B	294.04 B	207.12 B	233.69 B
	FC ₁₃	825.96 A	377.77 B	403.33 B	535.69 B
	QM9414	138.62 B	1403.94 A	1303.54 A	948.70 A
	DMS 1% = 173.05				
II	FC ₃₅	188.02 B	144.05 B	116.84 C	149.64 BC
	FC ₃₇	146.80 BC	115.73 B	108.11 C	123.55 C
	FC ₅₃	347.22 A	234.93 A	208.77 AB	263.64 A
	FC ₅₉	80.30 C	136.90 B	139.68 BC	118.96 C
	QM9414	76.24 C	192.95 AB	253.78 A	174.32 B
	DMS 1% = 49.71				
III	FC ₇₇	101.16 A	95.65 C	109.11 B	101.98 B
	FC ₈₈	113.98 A	129.83 B	81.43 C	108.42 B
	QM9414	106.04 A	491.41 A	415.66 A	337.71 A
	DMS 1% = 11.73				
IV	FC ₁₀₂	521.23 A	124.64 B	131.46 B	259.11 C
	FC ₁₁₃	898.61 B	78.82 B	169.11 B	382.18 B
	QM9414	306.69 C	713.20 A	1023.00 A	681.00 A
	DMS 1% = 100,05				

* Médias de quatro repetições

** Média geral para enzimas

ROUMAS, 1988). Além disto, estudos estão sendo realizados no sentido mais amplo visando obter linhagens produtoras de celulase, com características favoráveis para a aplicação em processos fermentativos, como *Aspergillus nidulans* (BAGGA & SANDHU, 1987); *Thermoascus aurantiacus* e *Sporotrichum thermophile* (GRAJEK, 1987); *Trichoderma* sp. (CARVALHO, 1989).

Considerando os resultados obtidos, algumas linhagens isoladas no presente trabalho despertam grande interesse quanto a produção de celulasas, entre essas destacamos a linhagem de *Fusarium solani*, que embora sendo uma linhagem selvagem apresentou níveis de produção enzimática comparáveis a linhagem *T. reesei* QM9414, na qual foi obtida por um programa de melhoramento genético e apresenta características que favorecem sua utilização em processos industriais.

4.6. Determinação da atividade ligninolítica

A metodologia utilizada para detectar a atividade, está descrita no item 3.10.

De acordo com LEISOLA *et alii*, 1984, os métodos por análise residual permitem detectar concentrações de lignina no decorrer do processo biodegradativo. Neste experimento, a lignina utilizada como substrato foi extraída de bagaço de cana-de-açúcar, sendo que o sobrenadante originado desta extração, apresentou uma maior absorção à 281nm. Tal observação tem sido relatada como característica do polímero lignina (CARRAU *et alii*, 1987).

A Tabela 54, apresenta os resultados em absorbância da degradação de lignina, indicando em porcentagem a degradação total deste polímero para cada microrganismo avaliado. Segundo JANSHEKAR *et alii* (1981) o decréscimo da absorbância a 281nm pode ser atribuído à ação enzimática nos anéis aromáticos deste polímero. A linhagem *P. chrysosporium* conhecida como efetiva na degradação de lignina, foi utilizada como padrão neste experimento. Não foi encontrada nenhuma linhagem com atividade superior a *P. chrysosporium*. No entanto a linhagem *Fusarium solani*, foi considerada a melhor entre os isolados, degradando 53% do substrato, apresentando uma capacidade de degradação semelhante ao da *P. chrysosporium*. A Figura 8 apresenta a atividade lignolítica das linhagens expressa em porcentagem.

Tabela 54. Atividade ligninolítica dos isolados, comparada com a linhagem *Phanerochaeta chrysosporium* (os dados apresentados constituem a média de duas repetições)

Linhagens	Absorbância em ultravioleta - 281nm						% final de degradação
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	
<i>P. chrysosporium</i>	0,191	0,122	0,085	0,081	0,071	0,056	70,68%
FC ₅₃	0,176	0,159	0,122	0,103	0,092	0,083	52,84%
FC ₇₇	0,190	0,171	0,168	0,140	0,122	0,110	42,10%
FC ₈₈	0,200	0,188	0,188	0,171	0,144	0,133	33,50%
FC ₁₀₂	0,185	0,181	0,176	0,169	0,145	0,137	25,95%

Figura 8. Atividade ligninolítica de algumas linhagens selecionadas, comparadas à *Phanerochaeta chrysosporium*

Durante os ensaios ligninolíticos, foi observada uma fase de latência em relação à atividade, durante os dois primeiros dias de incubação. Tal fato foi também relatado por LEISOLA *et alii* (1983) e CARRAU *et alii* (1987) e sugeriram que provavelmente este período corresponde a fase de germinação dos conídios e indução do sistema ligninolítico. O máximo de atividade encontrada foi após o período de 10 dias de incubação,

sendo que após este período a quantidade de lignina degradada se manteve constante. Sendo assim, pode-se concluir que o período de incubação em torno de 10 dias é o ideal para a determinação da atividade.

Entre os isolados somente as linhagens *Fusarium solani* e *Aspergillus fumigatus* apresentaram a habilidade de degradar lignina. Na literatura os dois gêneros tem sido relatados como decompositores efetivos deste polímero. IWAHARA (1980) e HIGUSHI (1980) identificaram espécies de *Fusarium* encontradas no solo que degradam lignina. Enquanto que algumas linhagens de *Aspergillus fumigatus* tem sido extensivamente estudadas, quanto a biotransformação de lignina, apresentando atividades superiores a outras linhagens padrões utilizadas (KADAM & DREW, 1986).

4.7. Caracterização genética-citológica da linhagem de *Fusarium solani* selecionada

Estudos genéticos da conversão de celulose a glicose por processos enzimáticos, tem sido realizados principalmente no gênero *Trichoderma* (DURAND *et alii*, 1988), onde algumas linhagens são consideradas as melhores produtoras de celulasas. Entretanto, os resíduos utilizados como fonte de celulose contêm lignina que limitam o acesso à celulose e, conseqüentemente, a biodegradabilidade dos substratos lignocelulósicos. De acordo com a literatura a espécie *P. chrysosporium* oferece a vantagem de degradar lignina e possuir enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose. Entretanto a busca de linhagem com este potencial é fundamental, no sentido de obter um melhor aproveitamento destes resíduos.

A linhagem considerada a melhor produtora de celulase e com potencial de degradar resíduos lignocelulósicos selecionada foi a FC₅₃, isolada de cavacos de madeira estocados no pátio da Indústria Ripasa Celulose e Papel, identificada como *Fusarium solani* (Mart) App & WR. Esta linhagem possui características extremamente favoráveis para estudos genéticos, apresenta conídios uninucleados e desenvolve-se bem em meios de cultura variados (itens 4.2, 4.4.4), com um crescimento relativamente rápido quando comparado com outros microrganismos celulolíticos como *Humicola* sp (RODRIGUES, 1987), *Aspergillus niger* (GOLDMAN, 1988), *Trichoderma* sp (CARVALHO, 1989) e *T. pseudokoningii* (FURLANETTO, 1989). Sendo assim, alguns estudos envolvendo citologia e tratamento mutagênico foram realizados, no sentido de esclarecer alguns aspectos básicos fundamentais para futuros estudos genéticos.

4.7.1. Observação de algumas etapas da conidiogênese da linhagem

Fusarium solani

Com o objetivo de se acompanhar algumas fases da formação de esporos desta linhagem, analisou-se o seu crescimento em lâminulas sobre meio completo, com intervalos de 2, 4, 8, 12, 24, 36, 72, 96 e 120 horas, de acordo com a metodologia descrita no item 3.11. Os resultados de tais observações estão esquematizados na Figura 9.

Figura 9. Etapas da conidiogênese da linhagem *Fusarium solani*

Durante os períodos de 0 a 8 horas de incubação observou-se o desenvolvimento micelial a partir de macro e micro conídios, tal desenvolvimento se deu nas duas extremidades do conídio. Entre 12 a 24 foi identificado um grande desenvolvimento micelial ramificado, sendo que a germinação de conídios ocorreu em 36 horas. Na linhagem analisada verificou-se um tempo de germinação de conídios relativamente rápido,

comparado com outras linhagens. CARVALHO (1989) identificou o surgimento de conidióforo no período de 48 horas na linhagem QM9414 de *T. reesei*, quando cultivada sob as mesmas condições. Já no isolado *Trichoderma* sp, este mesmo autor, observou a presença desta estrutura em 24 horas de cultivo, sugerindo que a natureza selvagem desta espécie ("Virginidade genômica") contribuiu para uma conidiação acelerada. Em linhagens de *Aspergillus nidulans*, a conidiação tem sido observada em períodos de incubação em torno de 20 horas, variando para mais ou menos nos mutantes. Tal fato se deve as alterações ocorridas no material genético desta, em função do tratamento mutagênico (SOUZA, 1979). Sendo assim o *Fusarium solani* apresenta um tempo maior para o início da conidiação em relação às linhagens selvagens citadas, porém demonstrou uma conidiação em tempos reduzidos comparada aos dados relatados para *T. reesei* QM9414.

PASTUSHOK e AXEROLD (1976) indicaram a existência de um controle genético endógeno determinando o início da conidiação. Sendo assim, tais observações são de extrema importância para futuros estudos genéticos, uma vez que características morfológicas de conídios e estruturas miceliais podem ser utilizadas para diferenciação entre linhagens selvagens e mutantes.

Na Figura 10 pode se observar algumas características morfológicas das estruturas durante o processo de germinação de esporo. As etapas A, B, C, D, correspondem ao período de 0, 2, 4, 8 horas respectivamente, envolvendo a transição morfológica de um esporo diferenciado para um estágio de disdiferenciação do qual surge o tubo germinativo e conseqüentemente a primeira hifa vegetativa. Durante os períodos de 12 a 24

Figura 10. Observações citológicas das estruturas observadas durante a conidiogênese da linhagem de *Fusarium solani*

a, b (0, 2 horas respectivamente) macroconídio com septos uninucleados e microconídios uninucleados; c, d (4, 8 horas) desenvolvimento hifal a partir de macroconídios; e, f (12, 24 horas) desenvolvimento micelial com hifas septadas; g (36 horas) germinação de conídios h, i, j (72, 96, 120 horas respectivamente), aparecimento de clamidosporos.

horas (E, F) observou-se um desenvolvimento micelial, contendo hifas septadas transparentes em grandes quantidades. Em 36 horas (G), ocorre a transição da fase vegetativa para reprodutiva, caracterizada pelo surgimento de esporos assexuais (conídios). As etapas observadas até esta fase compreendem o ciclo vital do fungo. Segundo TURIAM (1966) este é caracterizado pelo desenvolvimento de esporo à esporo, envolvendo processos morfogenéticos com complexidades variáveis. A partir de 72 horas de incubação observou-se o aparecimento de esporos de resistência, identificados como clamidosporos.

Segundo KIMATI (1989) o aparecimento de clamidosporos é característico neste gênero, desde que esteja sob condições adversas. Estes resultados levam a concluir que algum fator relacionado com o período de incubação, como por exemplo, fatores fisiológicos envolvendo o esgotamento dos nutrientes do meio utilizado, ou a diminuição da umidade e alterações de pH, provocadas pelo crescimento do fungo ou ainda a simples presença da lamínula, levaram a formação de clamidosporos. RODRIGUES (1989) verificou que a simples presença do redutor de colônia, desoxicolato de sódio induz o aparecimento de clamidosporos na linhagem selvagem *Trichoderma* sp.

Na linhagem de *F. solani* verificou-se a presença de microconídios uninucleados e vacuolados e macroconídios septados contendo um núcleo em cada septo, onde o estágio microconidial foi predominante, já relatados no item 4.4.3. BOOTH (1971), relatou que todas as espécies de

KIMATI, H., 1989. Comunicação pessoal.

Fusarium desenvolvem os estágios macro e microconidiais; e, inclusive algumas espécies que não tem sido relatado o estágio microconidial são capazes de desenvolvê-lo se os macroconídios forem induzidos para germinar sob condições adversas. Sendo assim, podemos concluir que a maior ocorrência de macroconídios durante este tipo de cultivo também poderiam estar correlacionados com as condições do meio.

4.7.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta

A linhagem selecionada foi avaliada quanto a sua sobrevivência ao mutagênico luz ultra-violeta, com o propósito de se verificar o comportamento desta frente ao mutagênico, assim como estabelecer uma curva de sobrevivência, para a obtenção de mutantes visando futuros estudos genéticos nesta linhagem.

Suspensões de conídios de *Fusarium solani* foram irradiados com luz ultra-violeta, de acordo com o item 3.12. A Tabela 55 e Figura 11 mostram os dados referentes a porcentagem e curva de sobrevivência respectivamente. A porcentagem de sobrevivência em torno de 5% foi obtida aos 3 minutos e 45 segundos de tratamento. A linhagem apresentou grande susceptibilidade a luz ultra-violeta, apresentando uma redução acentuada de células viáveis/ml no decorrer do tratamento. A sensibilidade ao mutagênico luz ultra-violeta tem sido relacionado com o tipo de pigmentação e número de núcleos por esporos (FURLANETTO, 1989). Ainda, GOLDMAN (1988) relatou para *A. niger* uma resistência a exposição luz ultra-violeta relacionada com a presença de conídios com pigmentação escura.

Figura 11. Curva de sobrevivência de *F. solani* à luz ultra-violeta

Tabela 55. Percentagem de conídios de *Fusarium solani* sobreviventes à luz ultra-violeta (os dados constituem média de três repetições)

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$1,217 \times 10^4$	100
T ₁	$9,7 \times 10^3$	77,16
T ₂	$4,8 \times 10^3$	37,7
T ₃	$2,29 \times 10^3$	18,03
T ₄	$4,5 \times 10^2$	3,54
T ₅	$8,4 \times 10^1$	0,66

Em *Humicola* sp verificou-se uma resistência mais acentuada a este tratamento, pois esta espécie além de apresentar conídios pretos, são multinucleados (MACEDO, 1986; RODRIGUES, 1987; ROUMAS, 1988). Segundo AZEVEDO, 1985, a resposta à um tratamento mutagênico se deve principalmente ao grau de pigmentação, dos números de núcleos por conídios e quantidade de DNA existente no material genético.

Durante a curva de crescimento foram isolados mutantes morfológicos encontrados. De acordo com a Tabela 56 não foi encontrado nenhum mutante no tempo de 1 minuto. No tempo de 4 minutos de exposição foi encontrado o maior número de variações morfológicas (Figura 12).

Tabela 56. Mutantes morfológicos resultantes do tratamento de conídios da linhagem *Fusarium solani*, com luz ultra-violeta, em diferentes tempos de tratamentos (total de três experimentos)

Exposição à U.V. (minutos)	nº de mutantes morfológicos	Características morfológicas
0	-	-
2	1	coloração alterada com redução de conidiação
3	1	coloração salmão, com crescimento reduzido
4	3	coloração cinza
	2	colônia compactada
	1	colônia com cresci- mento reduzido de coloração cinza
	3	colônia de colora- ção branca com es- porulação reduzida
5	1	colônia com pouca esporulação com uma coloração ama- relada no centro

Figura 12. Mutantes morfológicos de *Fusarium solani*, obtidos com 5% de sobrevivência à luz ultra-violeta

A obtenção de mutantes morfológicos com colorações diferentes permitem a identificação visual destes com grande facilidade. No entanto, para um futuro estudo genético pode se utilizar o tempo indicado como 5% de sobrevivência para obtenção destes mutantes, e também para marcas auxotróficas. GALLIANO *et alii* (1988) utilizaram em processos fermentativos, contendo substratos lignocelulósicos, linhagens mutantes de *P. chrysosporium*, hiperprodutoras de celulases, as quais mantinham a atividade ligninolítica, obtendo um aumento de 80% na taxa de sacarificação. A linhagem de *F. solani* demonstrou-se viável para os estudos referidos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- Os critérios adotados para o isolamento e seleção de fungos lignocelulolíticos a partir de materiais de indústrias de celulose, foram eficientes. Nessa busca, foi possível identificar uma alta variabilidade natural existente nos fungos para produção de enzimas celulolíticas e permitiu selecionar espécies com atividades de β -glicosidase, carboximetilcelulase e avicelase semelhantes às encontradas para a linhagem industrial QM9414 de *Trichoderma reesei*.

- A avaliação do crescimento e esporulação das linhagens selecionadas em diferentes meios de cultura demonstrou que o pH é um fator limitante no meio que contem celulose como fonte de carbono e que todas as linhagens selecionadas podem ser consideradas promissoras para se obter mutações auxotróficas uma vez que se desenvolveram bem em meio mínimo.

- Padrões eletroforéticos para α e β esterases permitiram correlacionar os perfis das bandas com a morfologia dos esporos das linhagens. A caracterização eletroforética pode ser considerada como um dos parâmetros auxiliares na classificação taxonômica de fungos isolados de habitats naturais como no caso do presente trabalho.

- A atividade "ligninolítica" pode ser constatada nas linhagens de *Fusarium solani* e *Aspergillus fumigatus*.

- A linhagem de *Fusarium solani* selecionada se mostrou promissora para estudos genéticos e de melhoramento genético para produção de enzimas lignocelulolíticas. A avaliação preliminar dessa linhagem evidenciou a presença de conídios brancos uninucleados, facilidade na obtenção de mutantes morfológicos com luz ultra-violeta, crescimento em meio mínimo e capacidade de produzir celulasas e ligninases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, S. *Experimental microbial ecology*. New Jersey, Academic Press, 1970. 80p.

ACEBAL, C.; CASTILLON, M.P.; ESTRADA, P.MATA, I.; COSTA, E.; AGUADO, J.; ROMERO, D.; JIMENEZ, F. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM9414 on physically treated wheat strant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 24:218-23, 1986.

ADHI, T.P.; KORUS, R.A.; CRAWFORD, D.L. Production of Major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by to streptomycetes in agited submerged culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 55:1165-68, 1989.

AMARAL, D.; COSTA, S.O.P.; SCHWAB, A.; OLIVEIRA, E.N.S.; BRANCO, C.L.; CURY, A.; TRAVASSOS, L.R. *Experimentos de Microbiologia Geral*. 3.ed. Curitiba, MEC/Universidade Federal do Paraná, 1967. 170p.

AMER, G. & DREW, S. Microbiology of lignin degradation. *Annual Reports*
* *on Fermentation Process*, 4:68-101, 1980.

- ANDER, P & ERIKSSON, K.E. The importance of phenol-oxidase activity in lignin degradation by the white-rot-fungus *Sporotrichum pulverulentum*, *Archives Microbiology*, Berlin, 109:1-8, 1976.
- ANDER, P. & ERIKSSON, K.E. Selective degradation of wood Components by white rot fungi. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 41:239-248, 1977.
- ANDER, P. & ERIKSSON, K.E. Lignin degradation and utilization by micro-organisms. *Progress Industrial Microbiology*, Amsterdam, 14:1-58, 1978.
- ANTUNES, L.A.F.; CEREDA, M.P.; CAMARGO, R. Decomposição simulada da palha de arroz e obtenção de microrganismos celulolíticos. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 29:533-43, 1986.
- ARAÚJO, E.F.; BARROS, E.G.; CALDAS, R.A.; SILVA, D.O. β -glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus, *Humicola* sp. *Bio-technology Letters*, Kew, 5:781-84, 1983.
- AUGUSTINE, N.R. Technology transfer from military requirements to public need. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6:1-8, 1976.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético de microrganismos e sua aplicação à hidrólise enzimática de biomassas. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2., Maringá, 1985. *Anais do Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, Maringá, FUEM, 1985. p.93-106.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Nacional, 1973. 288p.

- BAGGA, P.S. & SANDHU, D.K. Cellulase formation by *Aspergillus nidulans*. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka 65:635-642, 1987.
- BAZIN, M.J.; SAUNDERS, P.T.; PROSSER, J. I. Models of microbial interactions in the soil. *Critical Reviews Microbiology*, Boca Raton, 4:463-98. 1976.
- BERGHEM, L.E.R.; PETERSSON, C.G.; AXIO-FREDRICSSON, V.B. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-glucosicellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *European Journal Biochemistry*, Berlin, 53:55-62. 1975.
- BERNIER, R. & STUTZENBERGER, F. Extracellular and cell-associated forms of β -glucosidase in *Thermonospora curvata*. *Letters in Applied Microbiology*, New York, 7:103-7, 1988.
- BERTOLINI, O.A. Isolamento e Biologia de novos fungos celulolíticos. Piracicaba, 1987. 63p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).
- BETTS, W.B. & DART, R.K. The degradation of Lignin related compounds by *Aspergillus flavus*, *Journal of General Microbiology*, London, 134: 2413-20, 1988.
- BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:90-104, 1981.

BLANCHETTE, R.A. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 48:647-53, 1984.

BLONDEAU, R. Biodegradation of natural and sintetic humic acids by the white rot fungus *Phanerochaete Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 55:1282-85, 1989.

BOOTH, C. The genus *Fusarium*, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1971, 237p.

BRANDT, D. Remarck on the process economic of enzymatic conversion of cellulose to glucose. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 5:253-74, 1975.

BRODA, P. The production and utilization of lignocelulose. *Biotechnology Potentials and Limitations*. Berlin, S.Silva, 1986. p.283-91.

BUSWELL, J.A. & ODIER, E. Lignin biodegradation. *Critical Reviws in Biotechnology*, Boca Raton, 6:1-60, 1987.

CAMPOS, S.S. & PIETRO, R.C.L.R. Selection of cellulolitic fungi whith secrete β -glicosidase into the culture Medium. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 29:46, 1986.

CARRAU, F.M.; NEIROTTI, E.; GAGGERO, C.; AZEVEDO, J.L. Separation and Biodegradation of rice hulls and sugarcane bagasse alkali lignins. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 30:577-84, 1987.

- CARVALHO, C.M.V. Conidiação, obtenção de mutantes, heterocariose e atividade celulolítica na linhagem selvagem *Trichoderma* sp. Belo Horizonte, 1989. 141p. (Mestrado-Universidade Federal de Minas Gerais).
- CASTANON, M. & WILKE, C.R. Effects of the surfactant tween 80 on enzymatic hydrolysis of news paper. *Biotechnology Bioengineering*, New York, 23: 1365-72, 1981.
- CASTRO, V.G. Aspectos básicos da biologia e genética do *Trichoderma reesei*. Belo Horizonte, 1982. 134p. (Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- CHAVES, V.M.G., Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de Compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, 1982. 60p. (Mestrado, Universidade Federal de Viçosa).
- CHUA, M.G.S.; CHOI, S.; KIRK, T.K. Mycelium binding and depolymerization of synthetic ¹⁴C-labeled lignin during decomposition by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforshung*, Berlin, 37:55-61, 1983.
- COSSAR, D. & CANEVASCINI, G. Cellulase enzyme production during continuous culture growth of *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 24:306-10, 1986.
- COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: RUSSEL, G. E. ed. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Newcastle upon Tyne, Intercept, 1985. p.309-109.

- COWLING, E.B. & BROWN, W. Cellulase and their Applications. *Advances in chemistry series* 95:152, 1969.
- CRAWFORD, D.L. & CRAWFORD, R.L. Microbial degradation of lignin, *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 2:11-27, 1980.
- CRAWFORD, D.L.; PROMETTO, A.L.; CRAWFORD, R.L. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 45:898-904, 1983.
- CRAWFORD, R.L. *Lignin biodegradation and transformation*. New York, * Wiley Interscience, 1981. p.56-57.
- CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 6:434-42, 1984.
- DANIEL, G.F.; NILSSON, T.; SINGH, A.P. Degradation of lignocellulosics by tunnel-forming bacteria. *Canadian Journal Microbiol.* Ottawa, 33:943-8, 1987.
- DREW, S.W. & KADAM, K.L. Lignin metabolism by *Aspergillus fumigatus* and white rot fungi. *Developments in Industrial Microbiology*, Arlington, 20:153-161, 1979.

- DURAN, N. & MANSILA, H. Degradação de lignina por catalise de transferência de eletrons: Um modelo de biopolpação. *Biotecnologia*, Piracicaba, (26):3-4, 1989.
- DURAND, H.; CLANET, M.; TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 10:341-6, 1988.
- ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M. ed. *Microbial Enzyme and Biotechnology*. Applied Science, 1983. cap.4, p.183-223.
- ERIKSSON, K.E. Degradation of cellulose. *Experientia*, 38:156-59, 1982.
- ERIKSSON, K.E. & HAMP, S.G. Regulation of endo-1,4 β -D-glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*, *European Journal of Biochemistry*, Berlin, 90:183-90, 1978.
- FAISON, B.D. & KIRK, T.K. Factors Involved in the regulation of a ligninase Activity in *Phanerochaete Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 49:299-304, 1985.
- FAISON, B.D.; KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Role of veratril Alcohol in Regulating Ligninase activity in *Phonerochaete Chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 52:251-254, 1986.
- FAN, L.T.; LEE, Y.H.; BEARDMORE, D.H. Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. In: FIECHTER, A. *Advances in Biochemical Engineering*, Springer-Verlag, 1980. vol.2. p.101-117.

- FARGERSTAM, L.G. & PETTERSSON, L.G. The cellulolytic complex of *Trichoderma reesei* QM9414. *FEBS Letters*, Amsterdam, 98:363-7, 1979.
- FARKAS, V.; JALANKO, A.; KOLAROVA, N. Characterization of cellulase complexes from *Trichoderma reesei* QM9414 and its mutants by means of analytical isoelectro focusing in polyacrylamide gels. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 706:105-10, 1982.
- FENN, P.; CHOI, S.; KIRK, T.K. Ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*: physiology of suppression by NH_4^+ and L-glutamate. *Archives of Microbiology*, Berlin, 130:66-71, 1981.
- FENN, P. & KIRK, T.K. Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic Activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives Microbiology*, Berlin, 130:59-65, 1981.
- FENNINGTON, G.; LUPO, D.; STUTZEMBERGER, F. Enhanced cellulase production in mutants of *Thermomonospora curvata*. *Biotechnology and Bioengineering* New York, 24:2487-97, 1982.
- FONTY, G.; GOVET, P. NEBOUT, J.M. Development of the cellulolytic microflora in the rumen of lambs transferred into sterile isolators a few days after birth. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 35: 416-22, 1989.

- FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; PERDIH, A. Comparison of different cellulolytic fungi for bioconversion of apple distilley waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 24:432-4, 1986.
- FUJII, M. & SHIMIZU, M. Synergism of endoenzyme and exo enzyme on hydrolysis of soluble cellulose derivates. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 18:878-82, 1986.
- FUKUDA, H.; IMURA, M.; KISAHARA, H.; KIRIMUDA, K.; USAMI, S. Effects on the addition of laminaram on β -glucosidase production by *Trichoderma viride*. *Journal Fermentation Technology*. Osaka, 65:91-93, 1987.
- FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulasas em *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*. Piracicaba, 1989. 151p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GALLIANO, H.; GAS, G.; DURAND, H. Lignocelulose Biodegradation and Ligninase excretion by mutant strains of *Phanerochaete chrysosporium* Hyperproducing cellulases. *Biotechnology Letters*, Kew, 10:655-60, 1988.
- GHOSE, T.K. & GHOSH, P. Cellulase production and cellulose hydrolysis. *Process Biochemistry*. London, 14:20-24, 1979.
- GIROUX, H.; VIDAL, P.; BOUCHARD, J.; LAMY, F. Degradation of Kraft Indulin lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*. *Applied and Environmental Microbiology*. Baltimore, 54:3064-70, 1988.

- GOKSOYR, J. & ERIKSEN, J. Cellulase. In: ROSE, A.H., ed. *Microbial Enzymes and Bioconversions*. London, Academic Press, 1980. p.283-330.
- GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulasas em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1988. 153p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GOLDMAN, G.H. & AZEVEDO, J.L. A simple screening of the cellulolytic activity of *Trichoderma* spp isolates in comparison with *T. reesei* QM9414. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 30:267-73, 1987.
- GONG, C.T.; LADISCH, M.R.; TSAO, C.T. Biosynthesis, purification and mode of action of cellulase of *Trichoderma reesei*. *Advances in Chemistry Series*, Whashington, 181:261-87, 1979.
- GONG, C.S. & TSAO, C.T. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D. ed. *Annual reports on fermentation processes*. London, Academic Press, 1979. vol.3, p.111-40.
- GRAJEK, W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in Submerged and-solid-stak fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin. 26:126-129, 1987.
- GROLEAU, D. & FORSBERG, C.W. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides Succinagenes*. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, 27:517-530, 1981.

- HALKETT, W.F.; CONNORS, W.J.; KIRK, T.K.; ZEIKUS, J.G. Microbial decomposition of synthetic ^{14}C -labeled lignins in a variety of natural materials. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 33:43-51, 1977.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_y cellulase activity of microorganisms. *Journal of General Microbiology*, London, 98:109-115, 1977.
- HATAKKA, A.L. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 18:350-7, 1983.
- HATAKKA, A. & TERVILÄ-WILO. Ligninases of white-rot fungi. In: SOVIET-FINNISH SEMINAR ON MICROBIAL DEGRADATION OF LIGNOCELLULOSIC RAW MATERIALS: s.n.t. *Proceedings*, Thessalonika, 1985. p.65-75.
- HATAKKA, A.L. & UUSI-RAUWA, A.K. Degradation of ^{14}C -labelled poplar wood lignin by selected white rot fungi. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 17:235-42, 1983.
- HERR, D. Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in submerged culture on different substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 21:1361-71, 1979.
- HIGHLEY, T.L. Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and Brown-rot fungi. *Wood and Fiber*, Madison, 5:50-8, 1973.

- HIGUCHI, T. Microbial degradation of dilignol as model compounds. In: lignin biodegradation Microbiology Chemistry and Applications, volume 1, KIRK, T.K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.M. eds. CRC Press, Boca Raton, 1980. 171p.
- HUNG, B.R.; PATRON, L.L.; UGAROVA, M.A.; BECHSTEDT, N.N.; CLAPPES, S.W. Tween 80 and proteose peptone effect on cellulase production. *Acta Biotechnology*, Berlin, 8:461-464, 1988.
- ISHIHARA, T. The role of laccase in lignin biodegradation. In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. eds. *Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential application*, Boca Raton, CRC Press, 1981. vol. 2, p.17-34.
- IWAHARA, S. Microbial degradation of DHP. In: KIRK, T.K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.M. eds. *Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and Applications*, Boca Raton, CRC Press, 1980. vol.1, 151p.
- IYO, A.H. & ANTAL, S.P. Effects of different nitrogen sources on lignocellulose degradation and AAPPL production. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 7:75-78, 1988.
- JABBAR, A. & ILAHI, A. Evaluation of substrates for the biosynthesis of cellulase by *Trichoderma viride*. *Agriculture Biological Chemistry*, Tokyo, 45:1719-20, 1981.

JAGER, A.; CROAN, S.; KIRK, T.K. Production of ligninases and degradation of lignin in Agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 50:1274-8, 1985.

(X) JANSHEKAR, H.; BROWN, C.; FIECHTER, A. Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. Amsterdam, 130:81-91, 1981.

JANSHEKAR, H.; HALTMEIR, T.; BROWN, C. Fungal degradation of Pine and Straw alkali lignin. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 14:174-81, 1982.

JEFRIES, T.W.; CHOI, S.; KIRK, T.K. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 42:290-6, 1981.

KADAM, K.L. & DREW, S.W. Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white-rot-fungi Using ¹⁴C-Labeled and Unlabeled Kraft lignins. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 28:394-404, 1986.

KANTELINEN, A.; WALDNER, R.; NIKU-PAAYOLA, M.L.; LEISOLA, M.S.A. Comparasion on of two lignin-degradeng fungi: *Phlebia radiata* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 28: 193-98, 1988.

KEYSER, P.T.; KIRK, T.K.; ZEIKUS, J.G. Ligninolytic enzyme sistem of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen stariation. *Journal of bacteriology*, Baltimore,

135:790-7, 1978.

KIRK, T.K. Effects of micro-organisms on lignin. *Annual Review of Phytopathology*, Tokyo, 9:185-210, 1971.

KIRK, T.K. & CHANG, H.M. Decomposition of lignin by white rot fungi II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforchung*, Berlin, 29:56-64, 1975.

KIRK, T.K. & CHANG, H.M. Potential applications of bio-lignolytic systems. * *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:189-96, 1981.

KIRK, T.K.; CONNORS, W.J.; BLEAM, R.D.; HACKETT, W.F.; ZEIKUS, J. G. Preparation and Microbial decomposition of synthetic ^{14}C - lignins. *Proceedings National Academy of Sciences*. Washington, 72:2515-19, 1975.

KIRK, T.K.; CONNORS, W.J.; ZEIKUS, J.G. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 32:192-94, 1976.

KIRK, T.K.; CROAN, S.; TIEN, M.; MURTAGH, K.E.; FARREL, R.L. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 8:27-32, 1986.

KIRK, T.K.; SHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *P. chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, Berlin, 117:277-285, 1978.

- KIRKPATRICK, N.; REID, I.D.; ZIOMEK, E.; HO, C.; PAICE, M.G. Relationship between fungal biomass production and the brightening of hard wood Kraft Pulp by *Cariolus versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 55:1147-52, 1989.
- KLYOSOV, A.A. & RABINOWITH, M.L. *Enzymatic conversion of cellulose to glucose: Present state of the out and potential*. In: WINGARD, L.B.; BEREZIN, I.V.; KLYOSON, A.A. ed. *Enzyme Engineering future directions*. New York, Plenum Press. 1980. 165p.
- KNAPP, J.S. & LEGG, M. The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the production of cellulytic enzymes by *T.reesei*. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 61:319-29, 1986.
- KNAPPERT, D.; GRETHLEIN, H.; CONVERSE, A. Partial acid hidrolisis of poplar wood as a pretreatment for enzymatic hydrolyses. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, New York, 11:67-7, 1981.
- KUBBICEK, C.P.; MUHLBAUER, G.; KLOTZ, M.; JOHN, E.; FRANZ-KUBICEK, E.M. Properties of a conidial-bound cellulase enzyme system from *Trichoderma reesei*. *Journal of General Microbiology*, London, 134:1215-22, 1988.
- KUBBICEK, C.P. Release of Carboximethylcellulase and β -glucosidase from walls of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 13:226-31, 1981.

- KUWAHARA, M.; GLEN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 - dependent Oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, Amsterdam, 169:247-90, 1984.
- LABUDOVÁ, I. & FARKAS, V. Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 744:135-40, 1983.
- LANGSFORD, M.L.; GILKES, N.R.; WAKACHUK, W.W.; KILBURN, D.G.; MILLER, R. C.; WARREN, A.R.J. The cellulase system of *Cellulomonas fimi*. *Journal General Microbiology*. London, 130:1367-1376, 1984.
- LEATHAM, G.F. Cultivation of shiitake, the japanese forest mushroom, on lags: a potencial industry for the United States. *Forest Products Journal*, Madison, 32:29-35, 1982.
- LEE, Y.H. & FAN, L.T. Properties and mode of action of cellulase. *Advances Biochemical Engineering*. Berlin, 18:101-29, 1980.
- LEISOLA, M.S.A.; KOZULIC, B.; MEUSSODOERFFER, F.; FIECHTER, A. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 262:419-424, 1987.
- LEISOLA, M.S.A.; MEUSSODOERFFER, F.; WALDNER, R.; FIECHTER, A. Production and identification of extracellular oxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 2:379-82, 1985a.

LEISOLA, M.S.A.; THANEI-WYSS, U.; FIECHTER, A. Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 3:97-107, 1985b.

LEISOLA, M.; ULMER, D.; FIECHTER, A. Problem of oxygen transfer during degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. Berlin, 17:113-16, 1983.

LEISOLA, M.S.A.; ULMER, D.C.; WALDNER, R.; FIECHTER, A. Role of veratryl alcohol in degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 1:331-39, 1984.

LIWICKI, R.; PATERSON, A.; McDONALD, M.J.; BRODA, P. Phenotypic classes of phenolosidase-negative mutants of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 162: 641-44, 1985.

LOWRY, O.H.; ROSEN BROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological chemistry*, Baltimore, 193:265-75, 1951.

LUPPO, D. & STUTZENBERGER, F. Changes in endoglucanases patterns during growth of *Thermonospora curvata* on cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 54:588-9, 1988.

- MACEDO, J.M.B. Avaliação do Comportamento de *Humicola* sp com vistas ao melhoramento genético para a produção de celulasas. Rio de Janeiro, 1986. 90p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- MADAMWAR, D.; PATEL, S.; PARICH, H. Solid state fermentation for cellulases and β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, 67:424-26, 1989.
- MANDELS, M. Growth and cellulases production by *Trichoderma*. In: BAILEY, M.; ENERI, T.M.; KINKO, M. *Symposium on the enzymatic hydrolysis of cellulose*. Helsinki, the Finnish National Fund for Research and Development (SITRA), 1975. p.81-109.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology Bioengineering Symposium*. New York, 6:21-23, 1976.
- MANDELS, M. & REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 73:269-78, 1957.
- MANDELS, M. & REESE, E.T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 79:816-26, 1960.
- MANDELS, M.; WEBBER, I.; PARIZER, R. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology*, Baltimore, 21:152-4, 1971.

MARTIN, R.S.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R.; SCIAMANNA, A.F. Production of cellulase enzyme and hydrolysis of steam - exploded wood. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 23:564-9, 1986.

McCARTHY, A.J. & PRODA, P. Screening for lignin degrading actinomycetes and characterization of their activity against ^{14}C lignin-labelled wheat lignocellulose. *Journal of General Microbiology*, London, 130: 2905-13, 1984.

McHALE, A. & COUGHLAN, M.P. Synergistic hydrolysis of cellulose by components of the extracellular cellulase system of *Talaromyces emersonii*. *FEBS Letters*, Amsterdam, 117:319-22, 1980.

MACKINTOSH, M.E. & R. H. PRITCHARD. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research*, Cambridge, 4:320-22, 1963.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, 31:426-428, 1959.

MIRIUVORI, H.; SIEGLER, K.M.; SANDS, J.A.; MONTENECOURT, B.S. Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. *Biochemical Society Transactions*, Essex, 13:411-414, 1985.

MISHRA, C.; VAIDYA, M.; RAO, M.; DESHPANDE, V. Purification and properties of two exocellobiohydrolases from a cellulolytic culture of *Fusarium lini*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 51:430-434, 1983.

- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Preparation of mutants of *T. reesei* with enhanced cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 34:777-82, 1977a.
- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Semiquantitative plate assay for determination of cellulose production of *Trichoderma viride*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 33:178-83, 1977b.
- NAKAYAMA, M.; TOMITA, Y.; SUZUKI, H.; NISIZAWA, K. Partial proteolysis of some cellulase components from *Trichoderma viride* and substrate specificity of the modified products. *Biochimical Journal*, Cambridge, 79:955-66, 1976.
- NELSON, N. A photometric adoption on the somogy method for the determination of glucose. *Journal Biological Chemistry*, Baltimore, 153:375-80, 1944.
- NIKU-PAAYOLA, M.L. Lignolytic enzymes of the white-rot fungus. *Phebia radiata*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM WOOD AND PULPING CHEMISTRY. 4., Paris, 1987. *Proceedings*. S.n.t. 1987. vol.2, p.301-03.
- NJOKU, C.C. & ANTAL, S.P. Lignocellulose degradation and crude protein formation by three ligninolytic *Streptomyces* strains. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 4:133-36, 1987.
- NYBERG, P.M.A. & BAILEY, M.J. Utilization of β -glucosidase from *Aspergillus* species in the of cellulose. In: WEETAL, H.H. & ROYER, G.P. eds. *Enzyme engineering*, New York, Academic Press, 1980. vol.5, p.149-51.

- OKADA, G. Enzymatic Studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*
IV. Purification and properties of a less-random type cellulase.
Biochimical Journal, Cambridge, 80:913-22, 1976.
- OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis
of cellulose by surfactant. *Biotechnology and Bioengineering*, New
York, 28:1727-34, 1986.
- OTTER, D.E.; MUNRO, P.A.; SCOTT, G.K.; GEDDES, R. Desorption of *Trichoderma*
reesei cellulose by a range of desorbents. *Biotechnology and*
Bioengineering, New York, 34:291-98, 1989.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C.
Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos. Piracicaba,
FEALQ, 1988. 54p.
- PARRY, J.B.; STUART, J.C.; HEPINSTALL, J. Purification of the major
endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochemical Journal*,
Cambridge, 213:437-44, 1983.
- PASZCZYNSKI, A.; HUYNTH, V-B.; CRAWFORD, R. Comparasion of ligninase-1
and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysospor-*
ium. *Archives of Biochemical and Biophysics*, New York, 244:750-65,
1986.

- PASTUSHOK, M. & AXEROUD, D.E. Effect of glucose ammonium and media maintenance on the time of conidiophore initiation by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, Baltimore, 94:221-224, 1976.
- PETTERSON, G.; COWLING, E.B.; PORATH, J. Studies on cellulolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. Amsterdam, 67:1-8, 1963.
- PLATT, M.W.; HADAR, Y.; CHET, I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 20:150-4, 1984.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, C.M.; McDONALD, K.D.; BUFTON, A. W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances Genetics*. New York, 5:141-238, 1953.
- POULSEN, O.N. & PETERSEN. Electrophoretic and Enzymatic studies on the crude extracellular enzyme system of the cellulolytic bacterium *Cellulomonas* sp ATCC 21399. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 34:59-64, 1989.
- RAMACHANDRA, M.D.L.; CRAWFORD, D.L.; POMETTO, A.L. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: a comparative study of wild-type and genetically manipulated strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 53:2754-60, 1987.

RAMACHANDRA, M.P.; CRAWFORD, D.L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic Actinomyceto *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*. Baltimore, 54:3057-63, 1988.

RAO, M.; MISHAT, C.; GAIKWAD, S.; SRINIVASAN, C.M. Release of cellulase from *Penicillium janthinellum*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 28:129-32, 1986.

RAUTELA, G.S. & COWLING, E.B. Simple cultural tests for relative cellulolytic activity of fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 14::892-98, 1966.

REESE, E.T. Estimation of exo- β -1,4-glucanase in crude cellulase solutions. In: GOULD, R.F. ed. Cellulases and their Applications. Washington, Chemical Society, 1969. vol.95. p.26-33. (*Advances in chemistry series*).

REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivates and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 59:485-97, 1950.

- REID, I.D. The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot-fungus. *Phanerochaete chrysosporium*. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, 57:2050-8, 1979.
- REID, I.D.; ABRAMS, G.D.; PEPPER, J.M. Water-soluble products from the degradation of aspen lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, 60:2357-2364, 1982.
- RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba, 1987. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ROLZ, C.; LEON, R.; ARRIOLA, M.C.; CABRERA, S. White-rot fungal growth on sugar-cane lignocellulosic residue. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, 25:235-41, 1987.
- ROMANNELLI, R.A.; HOUSTON, C.M.; BARNETT, S.M. Studies on thermophilic cellulolytic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 30:276-281, 1975.
- ROUMAS, N.E. Produção de celulases e fusão de protoplastos em *Humicola* sp. Piracicaba, 1988. 168p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- RYU, D.D.Y. & MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme Microbial Technology*, Guildford, 2:91-102, 1980.

- SARKANEN, N.K. & LUDWIG, C.H., eds. *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. New York, Wiley Interscience, 1971. p.95-195.
- SCHWALD, W.; CHAN, M.; BREVIL, C.; SADDLER, J.N. Comparasion of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 28:398-403, 1988.
- SHEREVE, M.R. & BRINK, A.J. *Derivados da química da madeira*. Rio de Janeiro, Guanabara dois, 1980.
- SHEWALE, J.G. & SADANA, J.C. Purification, characterization and proprieties of β -glucosidases enzymes from *Sclerotium ralfsii*. *Archives of Biochimica et Biophysica Acta*. Amsterdan, 207:185-196, 1981.
- SHIMIDT, O. & WALTER, K. Succession and activity of microorganisms in stored bagasse. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 5:69-77, 1978.
- SHITOLA, H. & NEIMO, L. In: BAILEY, M.; ENARI, T.M.; LINKO, M., eds. "Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose" SITRA, Alanko, 1975. p.9.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* "METSH" Soroken. Piracicaba, 1983. 153p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *Journal Biological Chemistry*, Baltimore, 195:19-23, 1952.

SOUZA, N.R.D. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979. 244p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SREBOTNICK, E.; MESSENER, K.; FOISNER, R. Penetrability of white rot degraded Pine wood by the lignin Peroxidase of *P. chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 54:2608-14, 1988.

STERNBERG, D. A method for increasing cellulase production by *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 18:1751-1760. 1976.

STERNBERG, D.; VIJAYAKUMAR, P.; REESE, E.T. β -glucosidases: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 23:139-47, 1977.

STUTZENBERGER, F.J. Component-specific stimulation of cellulase secretion in *Thermonospora curvata* by the surfactant Tween 80. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 63:239-44, 1987.

STWEART, C.S.; DUNCAN, S.H.; JOBLIN, K.N. The use of tritiated cellulose for the rapid enumeration of cellulolytic anaerobes. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 1:45-7, 1985.

- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the matting between rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. *Ann. Phytopath. Soc Japan*. Tokyo, 45:182-191, 1979.
- TANSEY, M.R. Agar-diffusion assay cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Archives of Mikrobiologie*, Berlin, 77:1-11, 1971.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds., *Science*, London, 221:661-663, 1983.
- TONON, F. & ODIER, E. Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 54: 466-72, 1988.
- TORZILLI, A.P. & ANDRYKOVITCH. Degradation of *Spartina* lignocellulose by individual and mixed cultivates of sal-march fungi. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, 64:2211-15, 1985.
- TURIAN, G. Morphogenesis in *Ascomycetes*. In: AINSWORTH, G.C. e SUSSAMAN, A.S. eds. *The fungi II*. New York, Academic Press, 1966. 805p.
- ULHOA, C.J.; FELIX, C.R.; CALDAS, R.A. β -glucosidase enzymes of the cellulolytic fungi *Picnoporus sanguineus*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 29:45, 1986.

- ULMER, D.C.; LEISOLA, M.S.A.; FIECHTER, A. Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 1:13-24, 1984.
- UMEZURIKE, G.M. The cellulolytic enzymes of *Botryodiplodia theodromae* Pat. (Separation and characterization of cellulases and β -glucosidases). *Biochemical Journal*, Cambridge, 117:9-19, 1979.
- VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metharizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VARDAVAKIS, E. Vertical distribution and seasonal fluctuations of cellulolytic fungi in a typic calcixerol soil in greece. *Transactions of the British Mycological Society*. Cambridge, 86:668-72, 1986.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. Enzimas. In: VILLELA, G.G. Bioquímica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1966. cap.12. p.225-98.
- VITOLO, M. Obtenção e uso de enzimas industriais. *Biotecnologia*, (15), 1988.
- WIDDEN, P.; CUNNINGLAM, J.; BREIL, B. Decomposition of cotton by *Trichoderma* species: influence of temperature, soil type, and nitrogen levels. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 35:469-73, 1989.

- WILLICK, G.E. & SELIGY, V.L. Multiplicity in cellulase of *Schizophyllum commune*. *European Journal Biochemistry*, Berlin, 151:89-96, 1985.
- WOOD, T.M. Properties of cellulolytic enzyme systems. In: GOUGHLAM, M.P., ed. *Cellulose: production, properties and applications*. 611, Meeting. Galway, Society Hast Colloquium, 1985.
- WOOD, T.M. and McCRAE, S.I. The purification and properties of the C₁ component of *T. koningii* cellulase. *Biochemical Journal*, Cambridge, 128:1183-92, 1972.
- WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. Cellulase from *Fusarium soloni*. Purification and properties of the C₁ component. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, 57:117-133, 1977.
- WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochemical Journal*, Cambridge, 171:61-72, 1978.
- WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. Synergismo between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. In: *Advances in Chemistry Series*, volume 181. BROWN, D. & JURASEK, L. ed. p.181-209. American Chemical Society, Washington, D.C. 1979.

WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. Purification and some properties of a (1,4) β -D-glucon glucanohydrolase associated with the cellulose from the fungus *Penicillium funiculosum*. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, 110:291-303, 1982.

WOOD, T.M.; McCRAE, S.I.; MACFARLANE, C.C. The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biochemical Journal*, Cambridge, 189:51-65, 1980.

XIMENES, E.F.F. & FELIX, C.R. Isolation and characterization of the Intracellular and extracellular forms of β -glucosidase of *Humicola nigricans*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 29:46, 1986.

YANG, H.H.; EFLAND, M.J.; KIRK, T.K. Factors influencing fungal degradation of lignin in a representative lignocellulosic, thermomechanical pulp. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 22:65-9, 1980.

YOSHIOKA, H.; ANRAKU, S.I.; HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CMcase from *Humicola grisea* var. *thermoïdia* YH-78. *Agriculture and Biological Chemistry*, Tokyo, 46:75-82, 1982.

A P Ê N D I C E

Tabela 1. Isolados obtidos na coleta nº 1

Locais de origem	Fonte	Amostras
Indústria de Papel de Piracicaba S/A	estoque de celulose	FC ₁
		FC ₂
		FC ₃
		FC ₄
		FC ₅
		FC ₆
		FC ₇
		FC ₈
		FC ₉
		FC ₁₀
		FC ₁₁
		FC ₁₂
		FC ₁₃
		FC ₁₄
		FC ₁₅
Ripasa S/A	madeira em decomposição	FC ₁₆
		FC ₁₇
		FC ₁₈
		FC ₁₉
		FC ₂₀
		FC ₂₁
		FC ₂₂
		FC ₂₃
		FC ₂₄
		FC ₂₅
		FC ₂₆
		FC ₂₇
		FC ₂₈
Champion	madeira em decomposição	FC ₂₉
		FC ₃₀
		FC ₃₁
		FC ₃₂
		FC ₃₃

Tabela 2. Isolados obtidos na coleta nº 2

Locais de origem	Fonte	Amostras
Ripasa S/A	pilhas de cavacos de madeira	FC ₃₄
		FC ₃₅
		FC ₃₆
		FC ₃₇
		FC ₃₈
		FC ₃₉
		FC ₄₀
		FC ₄₁
		FC ₄₂
		FC ₄₃
		FC ₄₄
		FC ₄₅
		FC ₄₆
		FC ₄₇
		FC ₄₈
		FC ₄₉
		FC ₅₀
		FC ₅₁
		FC ₅₂
		FC ₅₃
Champion S/A	pilhas de cavacos de madeira	FC ₅₄
		FC ₅₅
		FC ₅₆
		FC ₅₇
		FC ₅₈
		FC ₅₉
		FC ₆₀
		FC ₆₁
		FC ₆₂
		FC ₆₃
		FC ₆₄
		FC ₆₅

Tabela 3. Isolados obtidos na coleta nº 3

Locais de origem	Fonte	Amostras
Ripasa S/A	cavacos de madeira	FC 66
		FC 67
		FC 68
		FC 69
		FC 70
		FC 71
		FC 72
		FC 73
		FC 74
		FC 75
		FC 76
		FC 77
		FC 78
		FC 79
		FC 80
		FC 81
		FC 82
		FC 83
Ripasa S/A	madeira em decomposição	FC 84
		FC 85
		FC 86
		FC 87
		FC 88
		FC 89
		FC 90
		FC 91
		FC 92
		FC 93
		FC 94

Tabela 4. Isolados obtidos na coleta nº 4

Locais de origem	Fonte	Amostras
		FC ₉₅
		FC ₉₆
		FC ₉₇
		FC ₉₈
		FC ₉₉
		FC ₁₀₀
		FC ₁₀₁
		FC ₁₀₂
		FC ₁₀₃
Champion S/A	pilhas de cavacos	FC ₁₀₄
	de madeira	FC ₁₀₅
		FC ₁₀₆
		FC ₁₀₇
		FC ₁₀₈
		FC ₁₀₉
		FC ₁₁₀
		FC ₁₁₁
		FC ₁₁₂
		FC ₁₁₃
		FC ₁₁₄
		FC ₁₁₅

Tabela 5. Avaliação do crescimento dos isolados em MMC (utilizando a média de três repetições em milímetros), em temperaturas diferentes durante 3 dias, 5 dias e 7 dias (coleta nº 1)

Amostras	Dias Temperatura M Ø das colônias	3 dias			5 dias			7 dias		
		28	37	44	28	37	44	28	37	44
FC ₁		38.3	18.3	0	48.3	32.0	0	58.3	41.3	0
FC ₂		85.0	2.3	0	90.0	23.0	0	90.0	33.0	0
FC ₃		33.3	26.6	0	43.3	35.0	0	90.0	33.0	0
FC ₄		23.3	28.0	0	43.3	31.6	0	66.6	40.0	0
FC ₅		28.3	21.6	0	46.6	31.6	0	71.6	45.0	0
FC ₆		0	0	0	4.6	0	0	4.6	0	0
FC ₇		26.6	7.6	0	26.6	8.0	0	43.3	15.3	0
FC ₈		36.3	0.6	0	86.6	1.6	0	90.0	6.0	0
FC ₉		0	0	0	1.0	0	0	5.3	0	0
FC ₁₀		85.0	0	0	90.0	4.3	0	90.0	10.6	0
FC ₁₁		15.0	1.6	0	90.0	0	0	90.0	0	0
FC ₁₂		23.0	6.0	0	36.6	11.0	0	39.6	13.3	0
FC ₁₃		3.0	18.3	0	43.3	18.3	0	45.6	18.3	0
FC ₁₄		20.8	2.3	0	41.6	3.6	0	44.0	3.6	0
FC ₁₅		25.0	2.3	0	38.3	5.0	0	43.6	5.3	0
FC ₁₆		10.6	0	0	14.0	0	0	20.3	0	0
FC ₁₇		2.0	0	0	28.3	0	0	29.0	0	0
FC ₁₈		2.0	0	0	35.6	0	0	40.0	0	0
FC ₁₉		18.3	5.3	0	28.3	93.0	0	30.0	9.3	0
FC ₂₀		15.0	0	0	23.3	0	0	30.6	0	0
FC ₂₁		20.8	0	0	36.6	0	0	41.3	0	0
FC ₂₂		0	0	0	5.0	0	0	5.0	0	0
FC ₂₃		10.0	0	0	15.5	2.6	0	20.6	8.0	0
FC ₂₄		20.0	0	0	32.6	0	0	40.6	0	0
FC ₂₅		10.0	6.0	5.0	16.3	9.6	5.0	20.3	14.3	7.3
FC ₂₆		19.0	13.0	10.6	19.3	21.6	21.0	23.3	24.0	23.3
FC ₂₇		6.0	4.6	4.3	15.6	9.3	7.6	19.0	11.6	22.3
FC ₂₈		11.6	7.0	0	21.5	11.0	0	23.0	12.6	0
FC ₂₉		14.6	8.3	6.0	26.6	16.0	10.0	29.3	17.6	11.3
FC ₃₀		15.0	3.6	3.6	21.6	5.3	3.6	24.6	5.3	3.6
FC ₃₁		17.3	36.6	50.0	38.3	56.6	70.0	41.0	61.3	85.0
FC ₃₂		11.3	0	0	14.6	0	0	19.6	0	0
FC ₃₃		3.6	0	0	10.0	0	0	15.0	0	0

Tabela 6. Análise de variância do crescimento em meio mineral de isolados obtidos na coleta nº 1

F.V.	G.L.	Q.M.	C.V.
Fungos	33	8599.89*	
Dias	2	7601.74*	
Calor	2	72809.7*	
Fungos - Dias	66	156.214*	
Fungos - Calor	66	2076.05*	
Dias - Calor	4	3055.46*	
Interação tripla	132	160.62*	
Repetições	2	4.61719ns	
Resíduo	610	9.43596	
Total	917		

* Existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade

ns. Não significativo

Tabela 7. Análise do tempo de cultivo adequado para cada isolado (coleta nº 1)

Amostras	3 dias	5 dias	7 dias	Média
FC ₁	18,9	26,8	33,2	26,3
FC ₂	29,1	37,7	41,0	35,9
FC ₃	20,0	26,1	41,0	29,0
FC ₄	17,1	25,0	35,5	25,9
FC ₅	16,6	26,1	38,9	27,2
FC ₆	0,0	1,5	1,5	1,0
FC ₇	11,4	11,5	19,5	14,1
FC ₈	12,3	29,4	32,0	24,6
FC ₉	0,0	0,3	1,8	0,7
FC ₁₀	28,3	31,4	33,5	31,1
FC ₁₁	5,5	30,0	30,0	21,8
FC ₁₂	9,7	15,9	17,6	14,4
FC ₁₃	7,1	20,5	21,3	16,3
FC ₁₄	7,7	15,1	15,9	12,9
FC ₁₅	9,1	14,4	16,3	13,3
FC ₁₆	3,5	4,7	6,8	5,0
FC ₁₇	0,7	9,4	9,7	6,6
FC ₁₈	0,7	11,9	13,3	8,6
FC ₁₉	7,9	12,5	13,1	11,2
FC ₂₀	5,0	7,8	10,2	7,7
FC ₂₁	6,9	12,2	13,8	11,0
FC ₂₂	0,0	2,0	2,0	1,3
FC ₂₃	3,3	6,0	9,5	6,3
FC ₂₄	6,7	10,9	13,5	10,4
FC ₂₅	7,0	10,3	14,0	10,4
FC ₂₆	14,2	20,6	23,5	19,4
FC ₂₇	5,0	10,8	17,6	11,1
FC ₂₈	6,2	10,8	11,9	9,6
FC ₂₉	9,6	17,5	19,4	15,5
FC ₃₀	7,4	10,2	11,2	9,6
FC ₃₁	34,6	55,0	62,4	50,7
FC ₃₂	3,8	4,9	6,5	5,1
FC ₃₃	1,2	3,3	5,0	3,2

Tabela 8. Análise da temperatura ideal de crescimento para cada isolado
(coleta nº 1)

Amostras	Temp. 1	Temp. 2	Temp. 3	Média
FC ₁	48,3	30,5	0,0	26,3
FC ₂	88,3	19,4	0,0	35,9
FC ₃	55,5	31,5	0,0	29,0
FC ₄	44,4	33,2	0,0	25,9
FC ₅	48,8	32,7	0,0	27,2
FC ₆	3,1	0,0	0,0	1,0
FC ₇	32,2	10,3	0,0	14,2
FC ₈	71,0	2,7	0,0	24,6
FC ₉	2,1	0,0	0,0	0,7
FC ₁₀	88,3	5,0	0,0	31,1
FC ₁₁	65,0	0,5	0,0	21,8
FC ₁₂	33,1	10,1	0,0	14,4
FC ₁₃	30,6	18,3	0,0	16,3
FC ₁₄	35,5	3,2	0,0	12,9
FC ₁₅	35,6	4,2	0,0	13,3
FC ₁₆	15,0	0,0	0,0	5,0
FC ₁₇	19,8	0,0	0,0	6,6
FC ₁₈	25,9	0,0	0,0	8,6
FC ₁₉	25,5	8,0	0,0	11,2
FC ₂₀	23,0	0,0	0,0	7,7
FC ₂₁	32,9	0,0	0,0	11,0
FC ₂₂	4,0	0,0	0,0	1,3
FC ₂₃	15,4	3,5	0,0	6,3
FC ₂₄	31,1	0,0	0,0	10,4
FC ₂₅	15,5	10,0	5,8	10,4
FC ₂₆	20,5	19,5	18,3	19,4
FC ₂₇	13,5	8,5	11,4	11,1
FC ₂₈	18,7	10,2	0,0	9,6
FC ₂₉	23,5	14,0	9,1	15,5
FC ₃₀	20,4	4,7	3,6	9,6
FC ₃₁	32,2	51,5	68,3	50,7
FC ₃₂	15,2	0,0	0,0	5,1
FC ₃₃	9,5	0,0	0,0	3,2

Tabela 9. Avaliação do crescimento dos isolados em MMC (utilizando a média de três repetições em milímetros), em temperaturas diferentes durante 3 dias, 5 dias e 7 dias (coleta nº 2)

Amostras	Dias Temperatura	3 dias			5 dias			7 dias		
		28°	37°	44°	28°	37°	44°	28°	37°	44°
FC ₃₄		41.6	34.0	0	41.8	38.0	0	48.7	44.3	0
FC ₃₅		38.3	0	0	38.6	0	0	46.0	0	0
FC ₃₆		37.6	41.6	0	41.3	41.6	0	49.1	50.0	0
FC ₃₇		28.3	30.0	0	30.2	33.0	0	44.8	42.6	0
FC ₃₈		42.6	0	0	42.6	44.0	0	52.0	41.6	0
FC ₃₉		35.3	9.6	0	47.3	14.3	0	53.6	31.3	0
FC ₄₀		11.0	0	0	12.0	0	0	14.0	0	0
FC ₄₁		42.3	16.6	0	45.6	30.6	0	48.6	31.6	0
FC ₄₂		36.0	25.6	0	38.6	39.5	0	50.8	43.6	0
FC ₄₃		21.6	10.3	0	36.6	23.0	0	35.8	0	0
FC ₄₄		41.6	0	0	46.3	12.6	0	45.0	19.3	0
FC ₄₅		29.0	16.6	16.0	38.6	40.6	43.0	49.3	49.6	49.6
FC ₄₆		0	0	0	30.0	0	0	36.6	0	0
FC ₄₇		8.3	27.3	27.3	33.0	46.3	48.3	47.1	49.3	45.6
FC ₄₈		19.6	15.0	0	40.6	0	0	46.3	0	0
FC ₄₉		11.3	20.6	20.6	24.3	44.3	34.6	43.0	41.6	42.3
FC ₅₀		0	0	0	37.0	21.6	0	46.3	21.6	0
FC ₅₁		6.6	21.6	18.0	32.6	26.0	0	45.0	46.0	48.0
FC ₅₂		0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC ₅₃		10.0	0	0	31.6	6.0	0	45.0	6.0	0
FC ₅₄		28.3	0	0	31.6	0	0	41.0	0	0
FC ₅₅		15.3	31.3	33.3	31.6	46.3	37.0	43.0	51.6	49.6
FC ₅₆		16.3	15.0	21.3	46.5	31.8	40.6	27.3	38.6	43.0
FC ₅₇		22.6	28.0	13.3	26.6	41.6	43.8	39.0	44.0	49.3
FC ₅₈		14.6	28.3	21.6	31.1	51.3	49.0	29.3	47.6	49.6
FC ₅₉		24.6	26.6	18.6	33.3	45.3	37.3	40.0	50.0	44.3
FC ₆₀		4.3	35.0	21.6	26.0	42.3	43.0	40.0	43.0	44.3
FC ₆₁		2.3	0	0	2.3	0	0	3.6	0	0
FC ₆₂		7.6	33.0	21.3	39.3	47.0	47.0	45.0	49.0	49.0
FC ₆₃		8.3	25.6	29.6	27.0	39.0	39.6	41.6	48.6	44.0
FC ₆₄		8.0	29.6	31.6	28.3	30.0	37.0	37.0	50.0	50.0
FC ₆₅		15.0	19.3	21.6	41.6	50.8	42.0	55.3	50.8	46.0

Tabela 10. Análise de variância do crescimento em meio mineral, para os isolados obtidos na coleta nº 2

F.V.	G.L.	Q.M.	Valor de F	C.V.
Fungos	31	3438.23	330.6*	
Dias	2	19193.28	1845.5*	
Temperatura	2	19358.94	1861.4*	
Fungos - Dias	62	249.70	24.0*	
Fungos - Temp.	62	1503.64	144.6*	
Dias Temp.	4	1039.89	100.0*	
Interação Tripla	124	107.07	10.3*	
Resíduo	576	10.44		
Total	863			

* Existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 11. Análise do tempo de cultivo adequado para cada isolado.
(coleta nº 2)

Amostras	3 dias	5 dias	7 dias	Média
FC ₃₄	25,2	26,3	31,0	27,5
FC ₃₅	12,7	11,6	15,3	13,2
FC ₃₆	26,4	27,6	33,0	29,0
FC ₃₇	19,2	22,4	29,1	23,6
FC ₃₈	26,4	28,3	31,2	28,6
FC ₃₉	15,0	22,6	26,2	21,2
FC ₄₀	3,6	15,5	15,5	11,5
FC ₄₁	19,6	25,4	26,7	23,9
FC ₄₂	20,5	26,0	31,5	26,0
FC ₄₃	10,6	19,8	19,8	16,8
FC ₄₄	13,8	19,6	21,8	18,4
FC ₄₅	23,0	41,6	49,5	38,0
FC ₄₆	0,0	11,6	12,2	7,9
FC ₄₇	21,0	42,5	48,3	37,2
FC ₄₈	6,5	27,6	29,5	21,2
FC ₄₉	17,5	34,4	43,2	31,7
FC ₅₀	0,0	19,5	22,6	14,0
FC ₅₁	15,4	25,5	46,3	29,1
FC ₅₂	0,0	0,0	0,0	0,0
FC ₅₃	10,0	10,5	17,0	12,5
FC ₅₄	9,4	10,5	13,6	11,2
FC ₅₅	26,6	38,3	48,1	37,7
FC ₅₆	17,5	36,3	42,7	32,2
FC ₅₇	21,3	37,3	44,1	34,2
FC ₅₈	21,5	34,7	45,5	33,9
FC ₅₉	23,3	40,2	43,2	35,5
FC ₆₀	20,3	36,1	43,1	33,1
FC ₆₁	0,8	0,8	1,2	1,0
FC ₆₂	20,6	42,1	47,6	36,8
FC ₆₃	21,3	35,2	45,0	33,8
FC ₆₄	23,1	32,3	45,6	33,7
FC ₆₅	18,6	44,8	46,4	36,6

Tabela 12. Análise da temperatura ideal de crescimento para cada isolado.
(coleta nº 2)

Amostras	28°	37°	44°	Média
FC ₃₄	43,8	38,7	0,0	27,5
FC ₃₅	39,7	0,0	0,0	13,2
FC ₃₆	42,7	44,4	0,0	29,0
FC ₃₇	33,3	37,4	0,0	23,6
FC ₃₈	45,7	40,2	0,0	28,6
FC ₃₉	45,4	18,4	0,0	21,2
FC ₄₀	34,7	0,0	0,0	11,5
FC ₄₁	45,5	26,3	0,0	23,9
FC ₄₂	41,8	36,2	0,0	26,0
FC ₄₃	31,6	18,7	0,0	16,8
FC ₄₄	44,7	10,6	0,0	18,4
FC ₄₅	39,0	37,6	37,5	38,0
FC ₄₆	23,8	0,0	0,0	7,9
FC ₄₇	29,5	41,0	41,3	37,2
FC ₄₈	29,0	34,7	0,0	21,2
FC ₄₉	26,2	36,4	32,5	31,7
FC ₅₀	27,7	14,4	0,0	14,0
FC ₅₁	28,1	31,2	28,0	29,1
FC ₅₂	0,0	0,0	0,0	0,0
FC ₅₃	24,4	0,0	0,0	8,1
FC ₅₄	33,6	0,0	0,0	11,2
FC ₅₅	30,0	43,1	40,0	37,7
FC ₅₆	36,4	28,5	31,6	32,2
FC ₅₇	29,4	37,8	35,5	34,2
FC ₅₈	28,3	43,4	31,0	33,9
FC ₅₉	32,6	40,6	33,4	35,5
FC ₆₀	23,4	40,7	35,3	33,1
FC ₆₁	3,0	0,0	0,0	1,0
FC ₆₂	30,6	43,0	36,7	36,8
FC ₆₃	25,7	37,7	38,0	33,8
FC ₆₄	25,0	36,5	39,5	33,7
FC ₆₅	32,5	40,1	37,2	36,6

Tabela 13. Avaliação do crescimento dos isolados em MMC (utilizando a média de três repetições em milímetros), em temperaturas diferentes durante 3 dias, 5 dias e 7 dias (coleta nº 3)

Amostras	Dias Temperatura	3 dias			5 dias			7 dias		
		28°	37°	44°	28°	37°	44°	28°	37°	44°
FC ₆₆		0	0	0	37.5	0	0	47.5	0	0
		0	0	0	37.0	0	0	46.5	0	0
		0	0	0	37.0	0	0	50.5	0	0
FC ₆₇		40.0	0	0	46.5	0	0	59.5	0	0
		45.0	0	0	46.0	0	0	57.5	0	0
		45.0	0	0	46.5	0	0	54.5	0	0
FC ₆₈		32.0	0	0	44.0	0	0	53.0	0	0
		33.0	0	0	47.5	0	0	53.0	0	0
		36.0	0	0	43.0	0	0	53.5	0	0
FC ₆₉		50.0	0	0	50.0	0	0	55.0	0	0
		49.0	0	0	50.5	0	0	54.5	0	0
		47.0	0	0	52.0	0	0	55.0	0	0
FC ₇₀		45.0	0	0	48.5	0	0	54.5	0	0
		46.0	0	0	48.5	0	0	55.0	0	0
		46.5	0	0	50.5	0	0	52.5	0	0
FC ₇₁		47.5	0	0	53.5	0	0	57.5	0	0
		51.5	0	0	43.5	0	0	53.5	0	0
		42.0	0	0	43.0	0	0	50.5	0	0
FC ₇₂		39.0	0	0	48.5	0	0	52.5	0	0
		37.7	0	0	49.5	0	0	53.5	0	0
		38.5	0	0	49.5	0	0	50.0	0	0
FC ₇₃		30.5	30.0	0	40.5	40.0	0	52.0	42.5	0
		31.0	30.5	0	38.0	39.5	0	56.0	41.0	0
		30.5	29.5	0	41.5	41.0	0	49.0	42.5	0
FC ₇₄		29.0	0	0	47.5	0	0	55.0	0	0
		33.5	0	0	47.5	0	0	54.0	0	0
		30.0	0	0	42.5	0	0	55.0	0	0
FC ₇₅		50.0	0	0	47.5	0	0	54.5	0	0
		51.0	0	0	49.0	0	0	54.5	0	0
		49.5	0	0	47.0	0	0	55.0	0	0
FC ₇₆		29.5	11.0	0	36.0	23.0	0	51.0	30.0	0
		30.0	11.0	0	36.0	21.5	0	49.5	27.0	0
		31.0	10.0	0	35.0	22.5	0	50.0	27.0	0
FC ₇₇		17.5	25.0	22.0	38.0	39.0	34.0	42.0	50.0	49.0
		13.0	25.0	25.5	33.5	38.5	29.0	42.5	57.5	68.5
		12.0	32.5	23.0	29.0	39.0	35.0	42.0	47.5	49.0
FC ₇₈		26.0	0	0	27.5	0	0	38.5	0	0
		25.5	0	0	25.5	0	0	41.0	0	0
		27.0	0	0	27.0	0	0	38.0	0	0
FC ₇₉		35.2	10.5	0	27.5	20.5	0	30.0	20.6	0
		37.5	10.0	0	27.5	20.0	0	31.0	21.0	0
		36.0	9.0	0	29.0	29.0	0	30.5	30.0	0
FC ₈₀		10.0	0	0	59.5	0	0	65.5	0	0
		12.0	0	0	51.0	0	0	61.0	0	0
		13.0	0	0	52.5	0	0	61.5	0	0

Tabela 13. Continuação

Amostras	Dias Temperatura	3 dias			5 dias			7 dias		
		28°	37°	44°	28°	37°	44°	28°	37°	44°
FC ₈₁		0	0	0	49.5	0	0	59.5	0	0
		0	0	0	46.0	0	0	56.6	0	0
		0	0	0	49.0	0	0	54.0	0	0
FC ₈₂		30.0	0	0	48.0	0	0	62.5	0	0
		32.0	0	0	50.5	0	0	63.0	0	0
		31.5	0	0	51.6	0	0	61.0	0	0
FC ₈₃		10.0	14.5	0	30.5	24.0	0	62.5	0	0
		11.0	15.0	0	32.5	20.0	0	63.0	0	0
		12.0	16.0	0	33.0	19.0	0	61.0	0	0
FC ₈₄		30.0	0	0	48.0	0	0	62.5	0	0
		32.0	0	0	50.5	0	0	63.0	0	0
		31.5	0	0	51.5	0	0	61.0	0	0
FC ₈₅		15.0	0	0	52.5	0	0	60.5	0	0
		13.5	0	0	50.0	0	0	59.0	0	0
		12.0	0	0	50.0	0	0	60.0	0	0
FC ₈₆		14.0	0	0	52.5	0	0	52.5	0	0
		13.0	0	0	51.5	0	0	56.0	0	0
		14.0	0	0	46.5	0	0	55.0	0	0
FC ₈₇		10.0	0	0	25.0	0	0	33.0	0	0
		15.0	0	0	24.0	0	0	36.0	0	0
		13.0	0	0	23.5	0	0	28.0	0	0
FC ₈₈		12.5	30.0	15.0	26.0	45.0	32.5	38.5	47.0	37.5
		13.0	29.0	10.0	32.0	45.5	33.0	39.0	46.0	38.0
		13.2	30.0	12.5	28.5	46.0	28.5	38.5	47.5	39.0
FC ₈₉		41.5	0	0	50.0	0	0	61.0	0	0
		43.0	0	0	52.5	0	0	62.0	0	0
		39.0	0	0	46.0	0	0	62.5	0	0
FC ₉₀		0	0	0	51.0	0	0	55.5	0	0
		0	0	0	51.0	0	0	57.5	0	0
		0	0	0	52.0	0	0	53.0	0	0
FC ₉₁		38.5	0	0	57.0	0	0	60.0	0	0
		38.5	0	0	52.5	0	0	59.0	0	0
		38.0	0	0	54.0	0	0	58.5	0	0
FC ₉₂		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC ₉₃		41.5	0	0	50.0	0	0	52.5	0	0
		43.0	0	0	47.5	0	0	50.5	0	0
		38.0	0	0	52.5	0	0	53.5	0	0
FC ₉₄		30.5	0	0	55.0	0	0	58.0	0	0
		26.5	0	0	52.5	0	0	54.5	0	0
		26.0	0	0	57.0	0	0	57.5	0	0

Tabela 14. Análise de variância do crescimento em meio mineral das linhagens obtidas na coleta nº 3

F.V.	G.L.	Q.M.	Valor de F	C.V.
Fungo	28	961.99	398.5*	9,38%
Dias	2	6752.22	2796.9*	
Temperatura	2	115704.50	47927.6*	
Fungos x Dias	56	131.86	54.6*	
Fungos x Temp.	56	969.08	401.4*	
Dias x Temp.	4	3844.77	1592.6*	
Int. tripla	112	120.34	49.8*	
Resíduo	520	2.41		
Total	782			

* Existem diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 15. Análise do tempo de cultivo adequado para cada isolado. (Coleta nº 3)

Amostras	3 dias	5 dias	7 dias	Média
FC ₆₆	0,0	10,5	14,0	8,1
FC ₆₇	14,4	15,5	18,2	16,0
FC ₆₈	11,2	14,9	17,8	14,6
FC ₆₉	16,2	16,9	17,7	16,9
FC ₇₀	15,2	16,3	18,0	16,5
FC ₇₁	16,3	16,3	18,0	16,9
FC ₇₂	12,7	16,3	17,3	15,5
FC ₇₃	20,2	26,7	31,4	26,1
FC ₇₄	10,2	15,2	18,2	14,5
FC ₇₅	17,6	15,9	18,2	17,2
FC ₇₆	13,6	19,3	26,0	19,6
FC ₇₇	21,3	35,0	47,5	34,6
FC ₇₈	8,7	8,8	13,0	10,2
FC ₇₉	15,3	15,9	17,0	16,1
FC ₈₀	3,8	18,1	20,3	14,1
FC ₈₁	0,0	16,0	18,8	11,6
FC ₈₂	10,3	16,6	20,7	15,9
FC ₈₃	8,5	17,6	16,5	14,2
FC ₈₄	13,6	25,6	31,4	23,5
FC ₈₅	4,5	16,9	19,9	13,7
FC ₈₆	0,0	16,7	18,1	11,6
FC ₈₇	4,2	8,0	10,7	7,7
FC ₈₈	18,3	35,2	41,2	31,6
FC ₈₉	13,7	16,5	20,6	16,9
FC ₉₀	0,0	17,1	18,4	11,8
FC ₉₁	12,7	18,1	19,7	16,8
FC ₉₂	10,7	16,1	17,3	14,7
FC ₉₃	13,6	16,6	18,8	16,3
FC ₉₄	9,2	18,2	18,8	15,4

Tabela 16. Análise da temperatura ideal de crescimento para cada isolado.
(Coleta nº 3)

Amostras	Temperaturas			Média
	Temp. 1	Temp. 2	Temp. 3	
FC ₆₆	24,5	0,0	0,0	8,1
FC ₆₇	48,2	0,0	0,0	15,0
FC ₆₈	44,0	0,0	0,0	14,6
FC ₆₉	50,9	0,0	0,0	16,9
FC ₇₀	49,6	0,0	0,0	16,5
FC ₇₁	50,7	0,0	0,0	16,9
FC ₇₂	46,5	0,0	0,0	15,5
FC ₇₃	41,0	37,3	0,0	26,1
FC ₇₄	43,7	0,0	0,0	14,5
FC ₇₅	51,7	0,0	0,0	17,2
FC ₇₆	38,6	20,3	0,0	19,6
FC ₇₇	29,9	39,3	34,6	34,6
FC ₇₈	30,6	0,0	0,0	10,2
FC ₇₉	31,6	16,6	0,0	16,1
FC ₈₀	42,3	0,0	0,0	14,1
FC ₈₁	34,9	0,0	0,0	11,6
FC ₈₂	47,7	0,0	0,0	15,9
FC ₈₃	30,8	11,8	0,0	14,2
FC ₈₄	39,6	31,1	0,0	23,5
FC ₈₅	41,3	0,0	0,0	13,7
FC ₈₆	34,8	0,0	0,0	11,6
FC ₈₇	23,1	0,0	0,0	7,7
FC ₈₈	26,8	27,3	40,6	31,6
FC ₈₉	50,8	0,0	0,0	16,9
FC ₉₀	35,5	0,0	0,0	11,8
FC ₉₁	50,6	0,0	0,0	16,8
FC ₉₂	44,3	0,0	0,0	14,7
FC ₉₃	49,1	0,0	0,0	16,3
FC ₉₄	46,3	0,0	0,0	15,4

Tabela 17. Avaliação do crescimento dos isolados em MMC (utilizando a média de três repetições em milímetros), em temperaturas diferentes durante 3 dias, 5 dias e 7 dias (coleta nº 4)

Amostras	Dias Temperatura	3 dias			5 dias			7 dias		
		28 ^o	37 ^o	44 ^o	28 ^o	37 ^o	44 ^o	28 ^o	37 ^o	44 ^o
FC ₉₅		45.0	0	0	87.0	0	0	87.0	0	0
		40.0	0	0	87.0	0	0	87.0	0	0
		41.0	0	0	87.0	0	0	87.0	0	0
FC ₉₆		24.0	22.0	12.0	38.5	55.0	45.0	71.0	87.0	65.0
		26.0	20.0	15.0	42.5	65.0	42.0	72.0	86.0	63.0
		28.0	20.0	13.0	40.5	63.5	43.0	71.5	86.5	63.5
FC ₉₇		24.0	0	0	35.0	0	0	56.0	24.0	0
		30.0	0	0	40.0	0	0	55.0	23.0	0
		23.0	0	0	37.5	0	0	55.5	23.5	0
FC ₉₈		40.0	0	0	87.0	0	0	86.0	16.0	0
		39.5	0	0	86.0	0	0	87.0	15.0	0
		40.0	0	0	85.0	0	0	87.0	13.5	0
FC ₉₉		5.0	0	0	17.0	7.0	0	28.0	10.0	0
		5.0	0	0	18.0	5.0	0	26.0	7.0	0
		6.0	0	0	17.5	6.5	0	27.5	9.5	0
FC ₁₀₀		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC ₁₀₁		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0
FC ₁₀₂		21.0	36.0	15.0	45.0	63.5	38.0	66.0	87.0	57.0
		22.0	37.0	10.0	47.5	61.0	37.5	67.0	86.0	58.0
		21.5	36.5	13	45.0	62.0	37.5	66.5	86.0	57.5
FC ₁₀₃		11.0	0	0	30.0	0	0	43.0	0	0
		13.0	0	0	27.0	0	0	40.0	0	0
		12.5	0	0	28.1	0	0	41.5	0	0
FC ₁₀₄		37.0	0	0	87.0	0	0	87.0	0	0
		36.0	0	0	86.0	0	0	86.0	0	0
		40.0	0	0	86.0	0	0	86.0	0	0
FC ₁₀₅		40.0	0	0	87.0	0	0	87.0	0	0
		40.0	0	0	85.0	0	0	86.0	0	0
		40.0	0	0	85.0	0	0	86.0	0	0
FC ₁₀₆		36.0	0	0	87.0	0	0	86.0	0	0
		31.9	0	0	85.0	0	0	86.0	0	0
		38.0	0	0	87.0	0	0	86.0	0	0
FC ₁₀₇		22.0	0	0	55.0	0	0	69.0	0	0
		20.0	0	0	60.0	0	0	66.0	0	0
		21.5	0	0	61.0	0	0	67.5	0	0
FC ₁₀₈		20.0	0	0	56.5	18.5	0	71.0	50.0	0
		18.0	0	0	55.0	22.5	0	75.0	50.0	0
		20.0	0	0	59.0	10.0	0	77.0	45.0	0
FC ₁₀₉		35.0	10.0	0	75.0	13.0	0	86.0	14.0	0
		38.0	75.0	0	74.0	95.0	0	86.0	10.0	0
		35.0	15.0	0	75.0	15.0	0	85.5	15.0	0
FC ₁₁₀		0	0	0	80.0	0	0	87.0	0	17.0
		0	0	0	81.0	0	0	85.0	0	11.0
		0	0	0	80.0	0	0	86.0	0	13.0
FC ₁₁₁		25.0	0	0	55.0	0	0	70.0	0	0
		23.0	0	0	55.0	0	0	70.5	0	0
		20.0	0	0	55.0	0	0	72.0	0	0
FC ₁₁₂		21.0	19.0	0	50.0	10.0	0	48.0	23.0	0
		18.0	15.0	0	47.0	26.5	0	51.0	30.0	0
		19.0	16.5	0	45.0	26.0	0	54.0	27.0	0
FC ₁₁₃		17.0	15.0	0	43.5	10.0	0	86.0	40.0	18.0
		18.0	12.0	0	44.0	16.0	0	86.0	40.0	17.0
		17.5	10.0	0	47.0	16.5	0	86.0	40.0	15.0
FC ₁₁₄		15.0	12.0	0	36.0	20.0	0	50.0	29.0	0
		10.0	12.0	0	34.0	20.0	0	50.0	24.0	0
		10.0	13.0	0	37.0	21.0	0	50.0	26.0	0
FC ₁₁₅		14.0	0	0	37.0	12.0	0	45.0	12.0	0
		19.0	0	0	29.0	9.0	0	45.0	12.0	0
		15.0	0	0	32.5	10.0	0	46.5	15.0	0

Tabela 18. Análise de variância do crescimento em meio mineral dos isolados na coleta nº 4

F.V.	G.L.	Q.M.	Valor de F	C.V.
Fungos	20	3814.16	1920.5*	0,71%
Dias	2	19110.90	9620.6*	
Temperatura	2	89760.64	45186.4*	
Fungos x Dias	40	484.61	244.0*	
Fungos x Temp.	40	2121.93	1068.2*	
Dias x Temp.	4	7065.51	3556.8*	
Fungos x Dias x Temp.	80	245.51	123.6*	
Resíduo	376	1.98		
Total	566			

* Existem diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade

Tabela 19. Análise de tempo de cultivo adequado para cada isolado. (Coleta nº 4)

Amostras	3 dias	5 dias	7 dias	Média
FC ₉₅	14,0	29,0	29,0	24,0
FC ₉₆	20,0	48,2	73,9	47,3
FC ₉₇	8,5	12,5	26,3	15,7
FC ₉₈	13,2	28,6	33,8	25,2
FC ₉₉	1,7	7,8	12,0	7,2
FC ₁₀₀	0,0	0,0	0,0	0,0
FC ₁₀₁	0,0	0,0	0,0	0,0
FC ₁₀₂	23,5	48,5	70,1	47,4
FC ₁₀₃	4,5	9,5	13,8	9,1
FC ₁₀₄	0,0	28,7	28,7	19,1
FC ₁₀₅	13,3	28,7	28,7	23,6
FC ₁₀₆	12,3	28,6	28,7	23,2
FC ₁₀₇	7,0	19,5	22,5	16,3
FC ₁₀₈	6,4	19,5	22,5	16,1
FC ₁₀₉	15,6	29,0	32,8	25,8
FC ₁₁₀	0,0	26,7	33,2	20,0
FC ₁₁₁	7,7	18,3	23,6	16,5
FC ₁₁₂	12,0	22,7	25,8	20,2
FC ₁₁₃	9,9	19,6	47,5	25,7
FC ₁₁₄	8,0	18,8	25,4	17,4
FC ₁₁₅	5,7	14,3	19,5	13,2

Tabela 20. Análise da temperatura ideal de crescimento para cada isolado.
(Coleta nº 4)

Amostras	Temperaturas			Média
	Temp. 1	Temp. 2	Temp. 3	
FC ₉₅	72,0	0,0	0,0	24,0
FC ₉₆	46,0	56,1	40,0	47,3
FC ₉₇	39,5	7,8	0,0	15,7
FC ₉₉	70,8	4,9	0,0	25,2
FC ₉₉	16,6	5,0	0,0	7,2
FC ₁₀₀	0,0	0,0	0,0	0,0
FC ₁₀₁	0,0	0,0	0,0	0,0
FC ₁₀₂	44,6	61,6	35,9	47,4
FC ₁₀₃	27,3	0,0	0,0	9,1
FC ₁₀₄	57,5	0,0	0,0	19,1
FC ₁₀₅	70,8	0,0	0,0	23,6
FC ₁₀₆	69,7	0,0	0,0	23,2
FC ₁₀₇	49,1	0,0	0,0	16,3
FC ₁₀₈	48,5	0,0	0,0	16,1
FC ₁₀₉	65,4	12,1	0,0	25,8
FC ₁₁₀	55,4	0,0	4,5	20,0
FC ₁₁₁	49,7	0,0	0,0	16,5
FC ₁₁₂	39,2	21,4	0,0	20,2
FC ₁₁₃	49,4	22,1	5,5	25,7
FC ₁₁₄	32,6	19,6	0,0	17,4
FC ₁₁₅	31,8	7,7	0,0	13,2