

CAROLINE NEUGEBAUER WILLE

POTENCIAL DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus* NA
BIOPOLPAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* E *Acacia mearnsii*

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas; área de concentração em Meio Ambiente.

Orientador: José Soares do Nascimento

Pelotas
Estado do Rio Grande do Sul
2007.

Banca examinadora:

.....
José Soares Do Nascimento

.....
Eduardo Bernardi

.....
Lorena Pastorini Donini

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me concedeu tudo que eu precisava para chegar até aqui, não por merecimento ou escolha minha, mas somente pela sua infinita bondade.

Agradeço aos meus pais por todas as oportunidades que me concederam, por sempre estarem dispostos a me socorrer em todos os apertos, por participar e se envolver em todas as atividades que desenvolvi e como não poderia deixar de afirmar, por me conceber e criar em um lar repleto de amor verdadeiro, inspirando os meus ideais.

Aos meus irmãos por dividirem o privilégio da atenção dos nossos pais e pelos momentos de carinho e descontração.

Ao meu amado esposo Vagner Euzébio Bastos pelo carinho, cumplicidade, paciência e por tornar essa jornada mais alegre através do estímulo do seu amor.

Agradeço a minha vó Nely Neugebauer e a minha dinda Nilza Silveira de Ávila pelos conselhos, apoio e motivação, também ao tio Armindo Silveira de Ávila que mesmo sem poder se expressar por palavras, sempre foi um exemplo de motivação.

A minha afilhada Juliana Wille, por preencher meu coração de alegria.

A toda minha família pelo amor, carinho, estímulo, suporte e paciência.

Agradeço ao meu orientador José Soares do Nascimento pela enorme paciência e compreensão, bem como pela coragem e otimismo na aceitação de idéias e projetos.

A minha colega Cristini Milech, por toda amizade dedicada nos bons e maus momentos, experiências compartilhadas e humorada convivência.

A amiga Therezinha Regina da Silva por ser um exemplo de dedicação, luta e força e por sua constante alegria.

A minhas colegas Karina Maculan, Cristini Milech, Paula Figueiredo, Nejara Medeiros, Lissane Valério, Alitcia K. e Simone Blume pelos ótimos momentos e amizade.

A professora Leila Macias pelos conselhos e amizade.

Agradeço aos professores Fábio Leivas Leite e Adriane Menezes pela primeira oportunidade de iniciar na pesquisa científica.

À Elizandra Minotto, Fernanda Rosa e demais colegas de laboratório pela agradável convivência

Ao professor André Ferraz da Faenquil por ceder gentilmente uma amostra do fungo *Ceriporiopsis subvermispota*.

Ao curso de Tecnologia em Controle Ambiental do Cefet- RS por apoiar este projeto de pesquisa, fornecendo recursos para as análises realizadas no Laboratório de Celulose e Efluentes- LACE.

Ao Professor Michel David Gerber por apoiar esta pesquisa.

Ao funcionário do LACE Juliano Schuch pela dedicação na execução das análises realizadas no LACE sob sua supervisão.

Ao colega de laboratório Eduardo Bermardi pela análise estatística dos resultados.

A seção de apoio estudantil pela concessão de bolsas de auxílio durante o período da graduação.

Dedico

A Deus por tudo que tenho e que sou ...
Aos meus pais Nilo Lange Wille e Márcia Neugebauer Wille pelo amor,
carinho, incentivo e atenção sempre dedicada...
Ao meu esposo Vagner Euzébio Bastos pelo amor e paciência
dispensados...

RESUMO

WILLE, Caroline Neugebauer. **Potencial do fungo *Pycnoporus sanguineus* na biopolpação de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii***. 2007. 56f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: José Soares do Nascimento

A produção de celulose e papel, no Brasil, é uma atividade com grandes perspectivas de crescimento, porém o aumento da demanda de polpa celulósica acarreta em diversos problemas ambientais. São necessárias mudanças urgentes neste setor produtivo, melhorando sua sustentabilidade econômica e ambiental. A extração de celulose pelo método de biopolpação, utiliza fungos de decomposição branca como agentes em um tratamento prévio da madeira, devido à capacidade destes organismos em degradar a lignina seletivamente, facilitando o processo de polpação. Diversos estudos têm demonstrado a capacidade deste tratamento de reduzir o consumo de energia, reagentes e impactos ambientais, além de melhorar algumas propriedades da polpa. Porém sua aplicação industrial está limitada pela dificuldade de produção de inóculo em larga escala e pela presença de contaminantes interferindo na qualidade do tratamento. Os fungos lignolíticos utilizados são predominantemente espécies importadas, sendo necessárias pesquisas com espécies nativas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial do fungo *Pycnoporus sanguineus* para o tratamento prévio de cavacos de *Acacia mearnsii* e *Eucalyptus grandis*, utilizando o fungo *Ceriporiopsis subvermispora*, amplamente reconhecido e utilizado neste processo como referência comparativa. Para tanto, foram conduzidos três experimentos. Nos experimentos 1 e 2, respectivamente, foram realizadas avaliações do crescimento miceliano em placas de Petri contendo meio de cultivo à base de serragem, e em tubos de ensaio, contendo cavacos umedecidos e esterilizados. Os meios inoculados com fungos foram incubados a 25°C, realizando-se diariamente medições do crescimento miceliano, a partir do segundo dia de incubação até a completa colonização em um dos tratamentos. No experimento 3, utilizaram-se os mesmos tratamentos dos experimentos anteriores, inoculando-se cavacos pré-umedecidos e pasteurizados a 100°C por 40 minutos. As amostras foram inoculadas e incubadas nas mesmas condições, foram realizados avaliações de colonização dos cavacos, indícios de contaminações e a degradação da lignina. Os resultados demonstraram uma maior velocidade de crescimento em meios à base de serragem para *C. subvermispora*, especialmente no meio com *E. grandis*. A velocidade de crescimento sobre os cavacos foi maior para *P. sanguineus*, especialmente sobre *A. mearnsii*, apresentando também uma colonização mais intensa. A utilização de serragem como substrato para a produção de inóculo mostrou-se viável, favorecendo a rápida colonização dos cavacos e diminuindo a possibilidade de surgimento de contaminantes durante o processo de incubação. Estes efeitos foram maiores para o *P. sanguineus* sobre *A. mearnsii*. Apesar dos resultados promissores na biopolpação houve interferências na metodologia de determinação da lignina degradada que não permitiram especificar qual foi o fungo mais indicado.

Palavras chave: Biopolpas, Podridão branca, Basidiomicetos, Fungos lignolíticos, Decomposição seletiva.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1- Basidioma de *Pycnoporus sanguineus* coletado na UFPel para o isolamento em laboratório. Pelotas- RS, 2007.....25

Figura 2- Tubos de ensaio contendo cavacos de madeira: **A=** logo após a inoculação e **B=** após os 7 dias de incubação. A/CS= *A. mearnsii* inoculada com *Ceriporiopsis subvermispora*, E/CS= *E. grandis* inoculado com *Ceriporiopsis subvermispora*, A/PS= *A. mearnsii* inoculada com *Pycnoporus sanguineus*, E/PS= *E. grandis* inoculado com *Pycnoporus sanguineus*. Pelotas- Rs, 2007.....28

Figura 3- Velocidade de crescimento miceliano (cm.dia^{-1}) dos isolados de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados em substrato cavacos de *A. mearnsii* e *E. grandis*. Pelotas – RS, 2007.....29

Capítulo 2

Figura 1- Velocidade de crescimento miceliano (cm.dia^{-1}) dos fungos *Ceriporiopsis subvermispora* (CS) e *Pycnoporus sanguineus* (PS), cultivados em meio à base de serragem de *A. mearnsii* e *E. grandis*.....36

Capítulo 3

Figura 1- Matriz primária e inoculo de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pycnoporus sanguineus*, respectivamente.....44

Figura 2- Moinho de facas.....45

Figura 3- Peneiramento, empacotamento e extração álcool- tolueno das amostras.....45

Figura 4- Cavacos de madeira submetidos ao biotratamento por 30 dias, A/CS= *A. mearnsii* inoculado por *C. subvermispora*; E/CS= *E. grandis* inoculado por *C. subvermispora*; A/PS= *A. mearnsii* inoculada com *P. sanguineus*; E/PS= *E. grandis* inoculado com *P. sanguineus*.....48

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1- Características anatômicas e físicoquímicas dos diferentes tipos de degradação da madeira (BLANCHETTE et al., 1988).....23

Capítulo 3

Tabela 1- Índice de colonização (porcentagem) de *Pycnoporus sanguineus* e *Ceriporiopsis subvermispora* em cavacos de *A. mearnsii* e *E. grandis*, aos 20 e 30 dias de incubação.....48

Tabela 2- Presença de contaminação aos 20 e 30 dias de incubação.....48

Tabela 3- Porcentagem de lignina total e porcentagem de lignina total degradada, após vinte e trinta dias de tratamento com *Pycnoporus sanguineus* e *Ceriporiopsis subvermispora*.....49

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	15
INTRODUÇÃO GERAL	13
Capítulo 1 Colonização de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Acacia mearnsii</i> em cavacos por <i>Pycnoporus sanguineus</i> e <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	17
Introdução.....	17
Introdução.....	18
Material e métodos	22
Resultados e Discussão.....	24
Conclusões.....	27
Capítulo 2 Desenvolvimento in vitro de <i>Pycnoporus sanguineus</i> e <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> em meios de cultura a base de serragem <i>Acacia mearnsii</i> e <i>Eucalyptus grandis</i>	28
Introdução.....	28
Introdução.....	29
Material e métodos	31
Resultados e Discussão.....	32
Conclusões.....	35
Capítulo 3 Biotratamento de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Acacia mearnsii</i> por <i>Pycnoporus sanguineus</i> e <i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	36
Introdução.....	37
Material e métodos	40
Resultados e Discussão.....	44
Conclusões.....	48
Referências	49

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a indústria de polpa e celulose possui uma importância econômica bastante significativa, por isso, ao longo de anos vem se buscando processos mais eficientes, que diminuam o impacto ambiental pelo consumo energético e geração de resíduos, melhorando a qualidade e a competitividade do produto.

Segundo Morais et al. (2007) o Brasil possui uma produção bastante significativa de papel, colocando-se entre os dez maiores produtores mundiais. Possuindo uma perspectiva de crescimento no mercado estrangeiro, devido a sua disponibilidade de recursos materiais e energéticos frente ao esgotamento destas fontes nos países em desenvolvimento. Porém a crescente preocupação e conscientização ambiental têm gerado impacto na indústria de papel e celulose, indicando a necessidade urgente de alternativas neste setor, responsável pela emissão de uma série de resíduos.

O processo de extração da celulose também conhecido como polpação da madeira pode ser feito por dois métodos, mecânico e químico. Ambos consomem altos níveis de energia elétrica, sendo o processo químico também responsável pela geração de resíduos, com implicações na poluição do ambiente. Isto ocorre principalmente devido à produção de um grande volume de efluentes, muitas vezes podendo alcançar valores acima de $200.000\text{m}^3/\text{dia}$, cujas características variam dependendo do processo de fabricação utilizado (REZENDE, 2000).

Uma publicação da Agência de Proteção Ambiental EPA, na década de 90 propôs uma redução severa nas emissões de resíduos permitidas, para regulamentação das indústrias de papel e celulose (SCOTT, 1995). Sendo assim, pode-se dizer que, a ampliação da produção de papel e celulose requer urgentes alterações do processo produtivo, pois apesar da alta demanda do mercado, existem limitações que devem ser consideradas, tais como o esgotamento de recursos hídricos e energéticos, e o aumento do rigor nas leis ambientais.

Atividades de remediação e tratamento de resíduos não são soluções efetivas para este problema. São ações de fim de tubo que acrescentam custos ao processo, sendo a melhor opção, a implantação de técnicas de produção mais limpa que visem à redução do consumo de insumos, energia necessária para produção e emissão de resíduos. Estas mudanças não só melhoram a condição ambiental, mas também geram benefícios às indústrias, pois podem reduzir os custos da produção, além de melhorar a aceitação do produto no mercado consumidor pela certificação e aquisição de selos ambientais.

Uma alternativa recentemente estudada, tem sido a produção de biopolpas, onde microrganismos podem ser aplicados nos processos de biobranqueamento e biopolpação. O biobranqueamento substitui ou reduz o uso de agentes químicos para o clareamento da polpa celulósica. Na biopolpação ocorre a extração de celulose facilitada pela utilização de fungos de decomposição branca como agentes em um tratamento prévio da madeira, devido à capacidade destes organismos de degradar a lignina seletivamente, facilitando o processo de polpação.

O processo usado para fermentação de materiais lignocelulósicos é conhecido como fermentação sólida. Este processo depende do tipo de substrato e de suas características, bem como das condições de incubação (CAPELARI, 1996). A melhora da qualidade do material depende da espécie de fungo, da fração botânica estudada e da preparação prévia do substrato para degradação fungica (KARUNANANDAA & VARGA, 1996).

A biopolpação é considerada um tipo de fermentação em estado sólido aplicada como um pré- tratamento fungico de cavacos de madeira para produção de polpas mecânicas ou químicas.(AKHTAR et al., 1998; MENDONÇA et al., 2002, 2004; FERRAZ et al., 2005). A partir disto, diversos estudos, realizados em escala de laboratório, demonstraram o potencial da biopolpação para reduzir impactos ambientais e o consumo de energia no processo de extração de celulose, bem como melhorar as propriedades da polpa celulósica.

Segundo Ferraz et al. (2006) a biodegradação de madeira sob condições controladas e com fungos pré-selecionados, tem se mostrado um importante processo biotecnológico de aplicação industrial recente.

A economia de energia durante a polpação mecânica é um fato bem conhecido (AKHTAR et al., 1998). Estudos demonstram uma economia de até 27% de energia, no caso da polpação quimiomecânica, e 18% no caso da polpação termomecânica (GUERRA et al., 2006). Além da redução no consumo de energia, a biopolpação, proporciona a obtenção de polpas celulósicas com melhor resistência a tração, rasgo e estouro (FERRAZ et al., 2006).

Dentre as espécies de fungos, atualmente estudados para tratar a madeira, destacam-se alguns basidiomicetos, classificados como fungos de decomposição branca, predominando espécies exóticas. Exemplos já estudados como *Phanerochaete chrysosporium* e *Ceriporiopsis subvermispora*, têm provado ser particularmente efetivos na degradação de lignina (BLANCHETTE et al., 1992; FERRAZ et al., 2006).

Embora se saiba das vantagens do método biológico, ainda existem dificuldades para implantação do processo em larga escala, principalmente porque as espécies de fungos estudadas apresentam baixo poder de competitividade com os fungos contaminantes durante o processo de colonização. Possivelmente estas espécies necessitem de um incremento no substrato e na temperatura para se estabelecer ou de outras alterações na metodologia de condução. Daí a importância de se estudar o processo de degradação de diferentes tipos de madeira por fungos e a viabilidade de sua aplicação na extração de celulose, tornando a produção de papel e polpa celulósica eficiente e economicamente competitiva.

No Brasil, há ocorrência de diversas espécies nativas com potencial decompositor de lignina, sendo algumas já cultivadas para outros fins. A pesquisa de fungos nativos de decomposição branca, para aplicação na biopolpação, pode revelar espécies que apresentem maior competitividade frente aos contaminantes e resultem em maiores benefícios a extração de celulose.

Segundo Eggert et al. (1996) o gênero *Pycnoporus* se mostra bastante promissor devido sua capacidade de produzir enzimas lignolíticas. Lamascolo et al. (2002) afirmam que linhagens de *Pycnoporus sanguineus* de origem tropical e subtropical produzem maior quantidade de enzimas lignolíticas que as linhagens de outras regiões.

Considerando-se estes aspectos em relação à utilização de espécies nativas e os efeitos dos contaminantes durante o processo, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial da espécie nativa *Pycnoporus sanguineus* no tratamento biológico de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii* para posterior polpação.

Capítulo 1

**Colonização de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii* em
cavacos por *Pycnoporus sanguineus* e *Ceriporiopsis*
*subvermispora***

Introdução

Como quase em todos grandes descobrimentos científicos, a proposta de utilização de fungos na degradação da lignina surgiu a partir da observação de fenômenos naturais, pois o crescimento de vários tipos de fungos sob a madeira pode ser facilmente confirmado pela observação da natureza.

Alguns fungos possuem um sistema complexo de mecanismos e enzimas que lhes permite a utilização de madeira e outros materiais lignocelulósicos, mesmo que pobres nutricionalmente, como substrato, desempenhando um papel fundamental na reciclagem de carbono na natureza (MARTÍNEZ et al., 2005). A obtenção de nutrientes, pelos fungos, ocorre por absorção através da parede celular em contato com uma solução nutritiva. O micélio segrega enzimas especiais que atuam sobre substâncias liquefazendo-as, e no caso dos fungos lignolíticos ocorre uma despolimerização da lignina. Em outras situações, especialmente no parasitismo de plantas, o micélio emite órgãos chamados apressórios que penetram na célula do hospedeiro, e se ramificam na forma de haustórios absorvendo os nutrientes intracelulares (GRIFFIN, 1994).

Os fungos podem atuar de diversas formas sobre a madeira. Existem aqueles que se limitam à superfície da madeira, especialmente quando úmida, alterando apenas sua aparência. Já os fungos manchadores utilizam como nutrientes substâncias contidas no parênquima, como amido, açúcares, sais minerais e outras substâncias da madeira recém cortada ou durante a secagem. Existem também os fungos apodrecedores que, por sua vez, apresentam potencialidades deterioradoras dos compostos da parede celular, catalizando-os e transformando-os em substâncias menos complexas e solúveis que possam ser absorvidas e digeridas, resultando em vários tipos de decomposição da madeira (MESQUITA et al., 2006). De acordo com Donini (2006) os fungos deste grupo são conhecidos como fungos de podridão branca da madeira por possuírem um aparato de enzimas que lhes permitem degradar e modificar a lignina, celulose e hemicelulose, processo que Martinez et al. (2005) acreditam ter sido originado no período Devoniano Superior, paralelo a evolução de plantas vasculares.

Os mesmos autores descrevem que os basidiomicetos que causam apodrecimento da madeira, podem ser divididos em dois grupos: fungos de podridão branca e fungos de podridão parda, baseado em aspectos macroscópicos. A degradação da lignina por fungos de podridão branca, especialmente quando este constituinte é degradado seletivamente na madeira, é uma característica que faz com que alguns fungos de decomposição branca sejam apropriados para aplicação industrial em processos onde a lignina ou vários compostos fenólicos necessitem ser modificados ou removidos (BLANCHETTE et al., 1988), estes mesmos autores citam que existem vários fungos de podridão branca que não realizam uma decomposição seletiva da lignina, removendo grandes quantidades de polissacarídeos. Estas espécies tem sido usadas erroneamente como representantes de todos os fungos de decomposição branca. Todavia existe uma grande variação entre fungos de decomposição branca e ainda existem aqueles que podem utilizar as duas rotas de decomposição, dependendo do substrato.

Blanchette et al. (1988) sugere uma série de características que indicam os principais tipos de interação fungica com a madeira como substrato, identificando as particularidades de cada rota de degradação (tab.1).

A biopolpação pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora* já foi explorada por diversos autores (AKHTAR et al.,1992; BLANCHETTE, 1992; FISCHER et al.,1994; SCOTT et al., 1995; FERRAZ et al.,2006). Porém sabe-se que a principal dificuldade de aplicar a biopolpação por esta espécie em escala industrial reside na sua suscetibilidade à contaminação. O processo de fermentação em estado sólido, a biopolpação, é influenciado por diversos fatores, como a espécie de fungo utilizado e o tipo de substrato e as condições de cultivo, sendo assim torna-se importante estudar diversas espécies nativas de fungos para o tratamento prévio de diferentes madeiras.

Tabela 1- Características anatômicas e físicoquímicas dos diferentes tipos de degradação da madeira (BLANCHETTE et al., 1988).

	Podridão branca		Podridão parda	Podridão soft	Fungos de manchas				
Perda da consistência	Perda da pigmentação, tornando a aparência alvejada, a madeira torna-se mais macia, esponjosa, e após um longo período a perda da consistência		Desintegração marrom seca e pulverulenta, perda da consistência muito uniforme	Desintegração marrom úmida perda da consistência uniforme	Ocorrem áreas da madeira descoloradas, com manchas azuis, negras, vermelhas, ou outras cores, causadas pelos pigmentos das hifas ou por uma reação da planta a agressão				
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Apodrecimento simultâneo</th> <th>Apodrecimento seletivo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Madeira dura, raramente madeira macia</td> <td>Ambas</td> </tr> </tbody> </table>		Apodrecimento simultâneo	Apodrecimento seletivo	Madeira dura, raramente madeira macia	Ambas	Madeira macia, raramente pode ocorrer em madeiras duras, tanto em madeiras expostas ao ambiente como em objetos de madeira	Geralmente madeiras duras, em ambientes úmidos.	Ocorre em ambos tipos de madeira tanto no ambiente, como também durante o armazenamento e transporte de madeira bruta.
Apodrecimento simultâneo	Apodrecimento seletivo								
Madeira dura, raramente madeira macia	Ambas								
Constituintes celulares degradados	Celulose, lignina e hemicelulose. Tornam-se quebradiços	Inicialmente há um ataque seletivo a lignina e a hemicelulose, após ocorre um ataque também à celulose. Tornam-se fibrosos	Celulose e hemicelulose, a lignina é pouco afetada, em alguns casos a degradação estende-se até a lamela média	Celulose e hemicelulose, a lignina quase não é alterada	Extratos ativos e soluções com água, como açúcares e gomas				
Rota anatômica de ação	A parede celular é atacada progressivamente e no lúmen. Há erosão em forma de sulcos onde as hifas crescem.	A degradação da lignina ocorre na lamela média e parede secundária. A lamela média é dissolvida através de um processo de difusão, onde não há contato com as hifas, formando cavidades radiais na parede celular	A degradação é realizada a uma longa distância das hifas através do processo de difusão. A parede celular inteira é atacada rapidamente através de fissuras e rachaduras	As células próximas às hifas são atacadas começando pelas células do lúmen. São formadas cavidades cilíndricas e cônicas na parede secundária ou erosão da parede secundária das células do lúmen.	Primeiramente afeta o parênquima e os canais de resina, gerando covas.				
Agentes causais	Basidiomycetes (e.g. <i>T. versicolor</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>P. chrysosporium</i> E <i>Heterobasidium annosum</i>) também alguns Ascomycetes (e.g. <i>Xylaria hypoxylon</i>).	Basidiomycetes (e.g. <i>Ganoderma australe</i> , <i>Phlebia tremellosa</i> , <i>C. subvermispora</i> , <i>Pleurotus</i> spp. E <i>Phellinus pini</i>).	Basidiomycetes exclusivamente (e.g. <i>C. puteana</i> , <i>Gloeophyllum trabeum</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i> , <i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Postia placenta</i> e <i>Serpula lacrimans</i>).	Ascomycetes (<i>Chaetomium globosum</i> , <i>Ustulina deusta</i>) e Deuteromycetes (<i>Alternaria alternata</i> , <i>Thielavia terrestris</i> , <i>Paecilomyces</i> spp.), também uma bactéria	Ascomycetes (e.g. <i>Ophiostoma</i> E <i>Ceratocystis</i> spp.) E Deuteromycetes (e.g. <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Phialophora</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.)				

De acordo com Donini (2006) a fase de miceliação do substrato possui uma importância fundamental para o crescimento dos cogumelos, pois quanto mais rápido ocorrer seu desenvolvimento menor são os riscos de ocorrerem contaminações, sua capacidade de crescer em substratos lignocelulósicos também está relacionada a sua capacidade de ativar mecanismos fisiológicos, sendo importante à seleção de linhagens de acordo com suas exigências nutricionais, favoráveis ao crescimento miceliano.

O objetivo deste trabalho foi comparar a velocidade de colonização da madeira pelo fungo nativo *Pycnoporus sanguineus* em relação a uma espécie exótica *Ceriporiopsis subvermispota*. Através do crescimento micelial em dois tipos de madeira: *A. mearnsii* e *E. grandis*, conduzidos em laboratório.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório Experimental de Micologia (LEMICO), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP) do Instituto de Biologia (IB), situado no campus Capão do Leão, RS da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

O fungo *Pycnoporus sanguineus* (Fig. 1) foi coletado no campus da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão,RS. No laboratório LEMICO/ DEMP/ IB/ UFPel, procedeu-se o isolamento a partir do basidioma, em condições assépticas, retirando pequenas porções deste e transferindo para o meio de cultivo batata dextrose agar (BDA), em placas de Petri sendo cultivadas durante sete dias, em estufa a 25°C.



Figura 1- Basidioma de *Pycnoporus sanguineus* coletado na UFPel para o isolamento em laboratório. Pelotas- RS, 2007.

Após o crescimento o fungo foi repicado para placas de Petri contendo o mesmo meio BDA, para multiplicação. Um isolado de *Ceriporiopsis subvermispora*,

cedida pelo Professor André Ferraz do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena- (FAENQUIL), também foi multiplicado em placas contendo BDA. As amostras foram cultivadas em estufa a 25°C durante sete dias.

Amostra de cavacos de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Acacia mearnsii* de Wild. fornecidas pelo Laboratório de Celulose e Efluentes (LACE) do Centro Federal de Educação Tecnológica (CEFET-RS), coletadas por quarteamento, foram mantidos imersos em água durante 24 horas. Após foram escorridos e colocados úmidos em tubos de ensaio, contendo um chumaço de algodão umedecido na base e na superfície, dos tubos, os quais foram vedados, com papel alumínio e filme de pvc, e autoclavados a 120°C por 30 minutos.

Após o resfriamento em condições ambientais, cada unidade / tubo recebeu um disco de micélio com 10mm de diâmetro, previamente crescidos em BDA. Foram utilizadas cinco repetições, sendo os tratamentos constituídos pela interação de dois fungos e dois tipos de madeira.

Os tubos foram incubados nas mesmas condições de crescimento do micélio em placas de Petri. As avaliações foram iniciadas após 48 horas de incubação, marcando-se o crescimento micelial a cada 24 horas durante cinco dias.

As informações foram calculadas e analisadas estatisticamente pelo programa SANEST (ZONTA & MACHADO, 1994) através do teste de Tukey.

Resultados e Discussão

A interação entre espécie de fungo, o substrato e o tempo de incubação foi significativa ($\alpha=0,05$). Os dados referentes à velocidade de crescimento diário do micélio dos isolados de *C. subvermispora* e *P. sanguineus*, cultivados em substrato cavacos de *A. mearnsii* e *E. grandis*, foram ajustados a modelos quadráticos e lineares, sendo as equações descritas juntamente com as curvas de crescimento ($\alpha = 0,05$).

O crescimento do micélio foi mais rápido em cavacos de *A. mearnsii* em ambos isolados, comparado ao crescimento em cavacos de *Eucalyptus grandis* (Fig. 2). Isto ocorreu devido à madeira de *A. mearnsii* apresentar uma menor densidade do que a de *E. grandis*, sendo a densidade da madeira proporcional a sua resistência à degradação, tanto química como biológica. O fungo *P. sanguineus* evidenciou-se uma equação quadrática enquanto para o *C. subvermispora* foi linear (Fig. 3), demonstrando o maior potencial deste fungo quando está crescendo na madeira, diferentemente do que ocorreu no crescimento *in vitro*, em meios de cultura à base de serragens destas respectivas madeiras, conforme observado no experimento 2. Possivelmente, a ação enzimática do *P. sanguineus* atue mais eficientemente, extraíndo nutrientes da madeira, favorecendo, assim o seu crescimento.

As diferenças na velocidade de crescimento passaram a ser expressas em torno do quinto dia de incubação, quando *P. sanguineus* destacou-se no crescimento em relação ao *C. subvermispora*. Outro aspecto que chamou a atenção foi à tonalidade miceliana branca e depois alaranjada na madeira, demonstrando uma intensa colonização, sendo mais evidente na *A. mearnsii* no *E. grandis*. Esta característica, observada visualmente, torna-se importante, pois conforme evidencia Ferraz et al. (2006) as espécies utilizadas na biodegradação não são bem estabelecidas na madeira, sendo a espécie *C. subvermispora* mais susceptível aos efeitos dos contaminantes no estabelecimento de uma competição, em escala industrial. Outra espécie com características similares ao *P. sanguineus* utilizada neste experimento, indicada pelos referidos autores, foi *Phanerochaete chrysosporium*, que demonstrou maior poder de competição. Desta forma, um substrato rapidamente colonizado, tende à homeostase, que diminui a ação de interferências externas e não permitindo que

outros fungos contaminantes se estabeleçam na madeira que foi mais rapidamente colonizada.

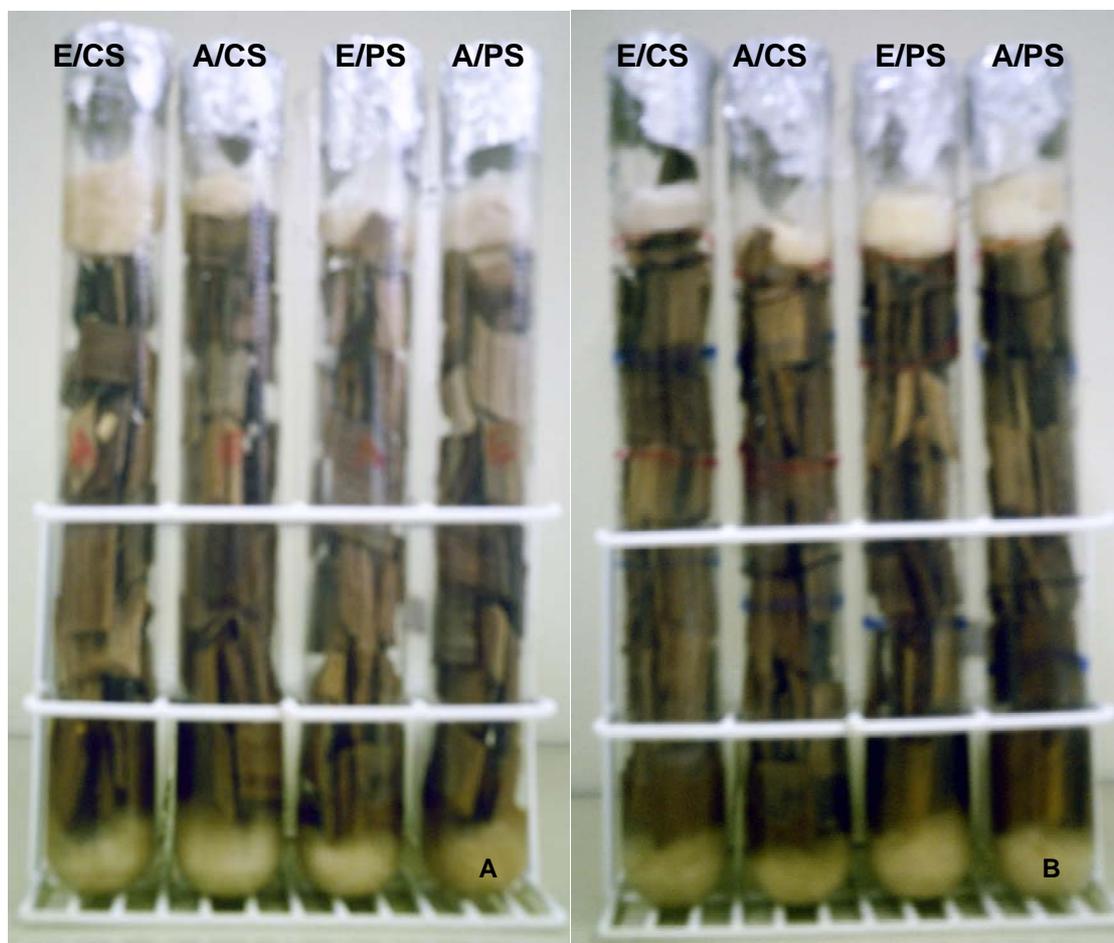


Figura 2- Tubos de ensaio contendo cavacos de madeira: **A=** logo após a inoculação e **B=** após os 7 dias de incubação. E/CS= *E. grandis* inoculado com *Ceriporiopsis subvermispota*, A/CS= *A. mearnsii* inoculada com *Ceriporiopsis subvermispota*, E/PS= *E. grandis* inoculado com *Pycnoporus sanguineus*., A/PS= *A. mearnsii* inoculada com *Pycnoporus sanguineus*, Pelotas- Rs, 2007.

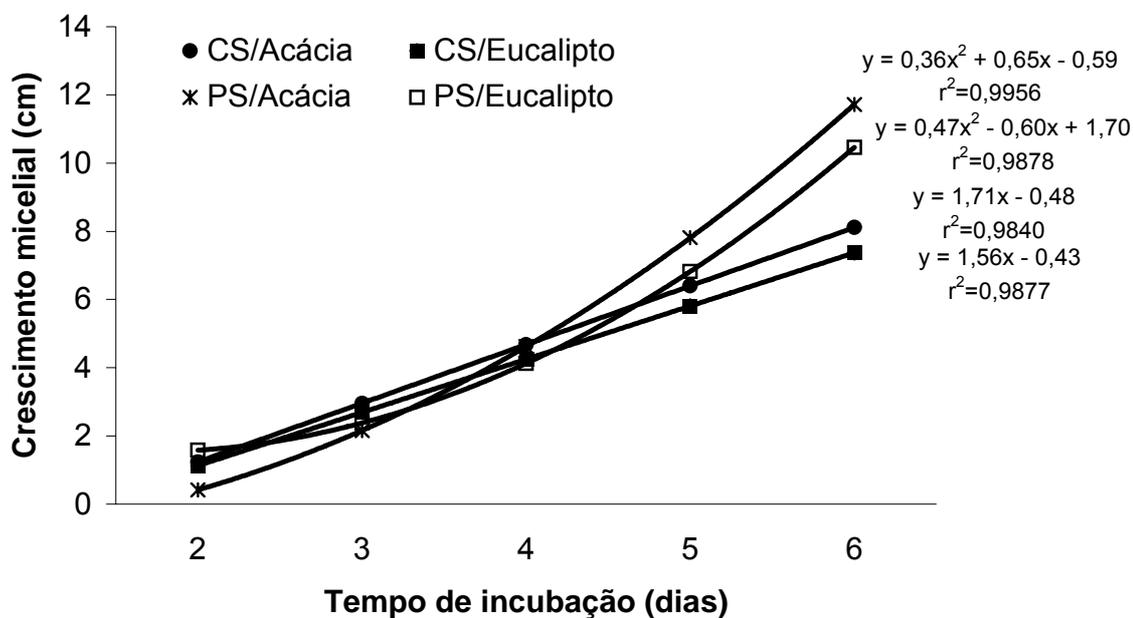


Figura 3- Velocidade de crescimento miceliano ($\text{cm}\cdot\text{dia}^{-1}$) dos isolados de *Ceriporiopsis subvermispota* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados em substrato cavacos de *A. mearnsii* e *E. grandis*. Pelotas – RS, 2007.

Conclusões

- O fungo *P. sanguineus* apresenta maior velocidade de crescimento nos substratos cavacos de *A. mearnsii* e *E. grandis* demonstrando maior potencial aos agentes de tratamento atualmente utilizados como o isolado de *C. subvermispora*.
- Dentre os dois tipos de madeira, a de *A. mearnsii* favorece a maior velocidade de crescimento miceliano, especialmente quando colonizada por *P. sanguineus*.

Capítulo 2

Desenvolvimento in vitro de *Pycnopus sanguineus* e *Ceriporiopsis subvermispora* em meios de cultura a base de serragem *Acacia mearnsii* e *Eucalyptus grandis*

Introdução

Segundo Martínez et al. (2005) os basidiomicetos de podridão branca, são caracterizados pela habilidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose, de forma seletiva. A lignina é seletivamente ou simultaneamente degradada em relação à celulose. Dois padrões de decomposição têm sido descritos em diferentes tipos de madeira, a deslignificação seletiva, também chamada decomposição seqüencial e a degradação simultânea.

A madeira mais explorada na fabricação de papel tem sido o *Eucalyptus* sp. Porém outras madeiras especialmente espécies nativas também apresentam potencial na extração, como é o caso da *Acacia mearnsii*. Outro aspecto em evidencia na extração de papel é a minimização de produtos químicos no preparo da madeira, em decorrência da poluição ambiental. Para isso, tem se utilizado fungos com capacidade de extração da celulose, denominados de biopolpadores. Estes são basidiomicetos, que apresentam lignases e outras exoenzimas capazes de degradar a lignina, sem afetar economicamente a celulose. Conforme Martínez et al. (2005), esse grupo de fungos degrada os polissacarídeos da madeira, somente modificando parcialmente a lignina, gerando um material que é constituído por lignina oxidada.

As etapas de aplicação de um destes fungos passam pelo isolamento da espécie em meio de cultura adequado, seleção de espécies mais promissoras, preparo do inóculo de forma mais adequada para que este colonize adequadamente a madeira e controle dos fatores que possam interferir durante o processo de incubação. Estas são etapas importantes, pois na maioria das pesquisas realizadas, houveram interferências no processo, como por exemplo, o uso de espécies decompositoras de baixa competição com os contaminantes ambientais, especialmente outros fungos. Portanto, torna-se imprescindível a utilização de espécies que demonstrem maior potencial de colonização. A colonização *in vitro*, nem sempre corresponde a uma colonização adequada no sistema de produção em larga escala, mas diminui as possibilidades de erro, pois os isolados que não crescem de forma favorável *in vitro*, não são indicados para a produção de inóculo.

Segundo Garcia (2006) deve-se considerar a composição do meio e as condições de cultivo utilizado em cada estudo, podendo estes fungos requerer

condições ainda não identificados que favoreçam a expressão de outras enzimas do sistema lignolítico. Diversos fatores influenciam a produção de lacases, tais como a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, relação carbono/nitrogênio, temperatura e aeração.

A capacidade do fungo crescer e produzir cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio e com a capacidade de ativar mecanismos fisiológicos, necessários para utilizar os nutrientes do meio de cultura (MATA et al., 2001). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a velocidade de crescimento de *Pycnoporus sanguineus* em relação *Ceriporiopsis subvermispora*, em meio de cultura à base de serragem de *Acacia. mearnsii* e *Eucalyptus grandis*.

Material e métodos

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Micologia (LEMICO), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP) do Instituto de Biologia (IB), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Neste experimento foram utilizados dois fungos, um isolado de *Pycnoporus sanguineus* e um isolado de *Ceriporiopsis subvermispora*.

O fungo *P. sanguineus* foi isolado a partir de um basidioma coletado no campus da UFPel, Capão do Leão - RS, enquanto o isolado de *Ceriporiopsis subvermispora* foi cedido pelo Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP.

Os meios de cultura Serragem- Dextrose- Agar utilizados foram preparados da seguinte forma: foram adicionados 25g de serragem de *Eucalyptus* sp. em 500mL de água destilada, fervendo-se por 15 minutos. O extrato obtido foi filtrado com auxílio de algodão, adicionando-se 5g de dextrose e 7,5g de agar e completou-se com água o volume 500mL. O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C por 30 minutos, sendo vertido em placas de Petri previamente esterilizadas. Este procedimento foi repetido para serragem de *A. mearnsii*.

Discos de 10mm de micélio previamente crescido em BDA foram inoculados no centro de cada placa, sendo inoculadas cinco placas de cada meio para cada tipo de fungo. As placas foram incubadas a 25°C até que o crescimento miceliano numa das repetições atingisse as extremidades da placa.

A variável analisada foi à velocidade de crescimento miceliano, sendo este medido com auxílio de uma régua, em oito direções ortogonais, a cada 24 horas, a partir de 48 horas após a inoculação, durante oito dias de incubação.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com fatorial AxBxC (A= espécie de fungo, B=substrato, C=leituras). A unidade experimental constou de uma placa de Petri, sendo realizadas cinco repetições para cada substrato. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variação e ao teste de Tukey para comparação das médias, e regressão polinomial para as leituras, utilizando-se o programa estatístico SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984).

Resultados e Discussão

Os isolados avaliados quanto ao crescimento miceliano, até o oitavo dia de incubação, apresentaram resultados com diferenças altamente significativas ($\alpha = 0,05$). Os dados referentes à velocidade de crescimento diário do micélio dos isolados de *C. subvermispora* e *P. sanguineus*, cultivados em meios à base de serragem de duas origens diferentes (*A. mearnsii* e *Eucalyptus* sp.), foram ajustados aos modelos cúbico, quadrático e linear sendo as equações descritas juntamente com as curvas de crescimento ($\alpha = 0,05$).

O isolado de *C. subvermispora* em meio de cultivo à base de serragem de *E. grandis* alcançou a borda da placa mais rapidamente, enquanto o isolado de *P. sanguineus* no mesmo meio, apresentou um crescimento menor (fig. 1). Neste caso, o principal fator que determinou a velocidade de crescimento foi à origem da serragem, ou seja, os dois isolados testados expressaram maior velocidade de crescimento quando o meio foi à base de *Eucalyptus* sp.. Notou-se que os dois isolados passaram a se diferenciar a partir do sexto dia de incubação, onde *C. subvermispora* alcançou o maior velocidade de crescimento miceliano.

O fungo *C. subvermispora*, espécie procedente do Canadá, foi cedida por pesquisadores do Departamento de Biotecnologia/FAENQUIL, Lorena, SP. Esta espécie tem sido amplamente citada pela sua capacidade de biodegradar a lignina. No meio utilizado, Serragem- Dextrose- Agar, houve um maior crescimento desta espécie, porém o micélio apresentou-se com crescimento delgado, aparentemente com pouca formação de massa miceliana, ao contrario do isolado de *P. sanguineus*, que se mostrou com micélio mais denso. Dados observados nos experimentos desenvolvidos por Ferraz et al. (2005, 2006) o meio de cultura utilizado foi Batata Dextrose Agar acrescido de extrato de levedura onde *C. subvermispora* desenvolveu-se bem. O isolado de *P. sanguineus* foi o que apresentou menor rapidez especialmente no meio serragem à base de *A. mearnsii*, demonstrado através da regressão linear, onde a velocidade de crescimento manteve-se praticamente constante durante o período de incubação.

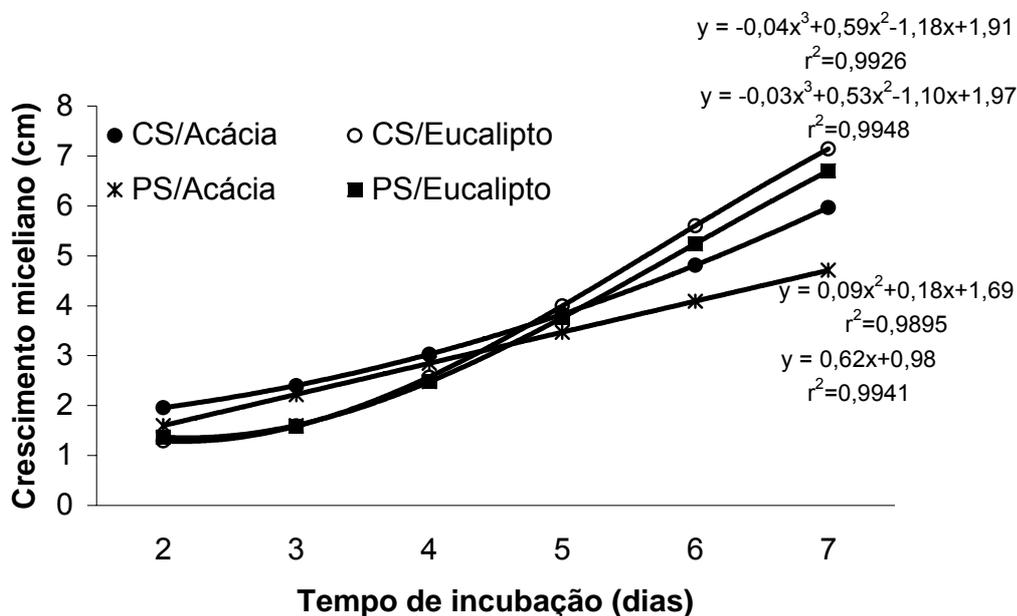


Figura 1- Velocidade de crescimento miceliano ($\text{cm}\cdot\text{dia}^{-1}$) dos fungos *Ceriporiopsis subvermispota* (CS) e *Pycnoporus sanguineus* (PS), cultivados em meio à base de serragem de *Acacia mearnsii* e *Eucalyptus grandis*.

A velocidade de crescimento está associada a diversos fatores, como temperatura, pH, concentração e disponibilidade de nutrientes (Donini, 2006). Provavelmente algum componente de caráter solúvel esteja relacionado a maior velocidade de crescimento miceliano em meio de cultivo à base de serragem de *E. grandis*, em relação ao meio à base de serragem de *A. mearnsii*. Segundo Kirk e Farrell (1987) o desenvolvimento da habilidade lignolítica, demonstrada em diversas pesquisas, requer condições nutricionais e culturais incluindo substrato metabolizável, altos índices de oxigênio, limites de nitrogênio e várias outras condições de cultivo. Para Leatham e Kirk (1983) a obtenção de rendimentos ótimos na degradação de material lignocelulósico pobre em nitrogênio requer uma suplementação. No trabalho desenvolvido por Ferraz et al. (2006) o meio BDA foi suplementado com extrato de levedura, e os inóculos utilizados na biopolpação foram suplementados com milhocina, obtendo resultados que favoreceram o desenvolvimento do micélio e a competição com contaminantes. Portanto o meio de serragem poderá ser um meio adequado para o

crescimento destas espécies, sendo necessário pesquisas que indiquem a adição de algum suplemento que favoreça o aumento na densidade do micélio.

Conclusões

- A velocidade de crescimento do isolado de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pycnoporus sanguineus* é maior nos meios formulados com serragem de *E. grandis*.
- A maior velocidade de crescimento foi do isolado *C. subvermispora* no meio de cultivo à base de serragem de *E. grandis*.
- Estes dois tipos de meios de cultivo devem ser adicionados de suplementos que favoreçam a maior densidade do micélio, especialmente para o fungo *Ceriporiopsis subvermispora*.

Capítulo 3

Biotratamento de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mearnsii* por *Pycnoporus sanguineus* e *Ceriporiopsis subvermispora*.

Introdução

O potencial dos fungos de decomposição branca para aplicações como biopolpação, biobranqueamento e tratamento de efluentes tem sido descrito por vários autores (ERIKSON & KIRK, 1985; BOURBONNAIS & PAICE, 1990; BLANCHETTE et al., 1992; FISCHER et al., 1994; SCOTT et al., 1995; POINTING et al., 2000; HATVANI & MECS, 2002; BRITO et al., 2004; SILVA et al., 2006).

O padrão de decomposição da madeira pode ser identificado por aspectos macroscópicos e microscópicos, geralmente alterações químicas na composição da madeira também são observadas após a degradação pelos fungos. Todavia, uma análise precisa do padrão de degradação exige análises químicas do conteúdo de celulose e lignina durante o processo de apodrecimento. (MARTÍNEZ et al., 2005)

A madeira e outros materiais lignolíticos são constituídos por três polímeros diferentes: celulose, lignina e hemicelulose.

A celulose é um polímero de celobiose que representa aproximadamente 50% do peso da madeira (MARTÍNEZ et al., 2005, p.195).

A lignina é um polímero de natureza aromática de alto peso molecular, estrutura irregular, cadeia ramificada, que tem como base estrutural unidades de fenil –propano, com um número variável de grupos hidroxílicos e metoxilicos ligados ao anel benzênico. Estas características conferem a lignina uma maior resistência à degradação, química ou biológica, e confere a madeira uma resistência mecânica. A maior parte deste polímero é encontrado na lamela média, onde funciona como cimento entre as demais fibras da madeira, mas também se faz presente na camada de células da parede celular, formando com as fibras da hemicelulose uma matriz amorfa onde as fibras de celulose estão encravadas e protegidas contra degradação (FENGEL & WEGENER, 1984).

Enzimas oxidativas extracelulares (oxirredutases) secretadas pelos fungos estão envolvidas no processo de degradação de componentes da parede celular (OTJEN & BLANCHETTE, 1986).

As lacases são conhecidas há muitos anos e estão presentes em plantas, fungos e insetos, desempenhando diversas funções incluindo síntese de pigmentos, morfologia dos corpos de frutificação e detoxificação. (MAYER & STAPLES, 2002)

Estas fenoloxidasas são características dos fungos de podridão branca e possuem um baixo potencial redox, permitindo somente a oxidação de unidades fenólicas de lignina, compreendendo 10% do total do polímero (MARTÍNEZ et al., 2005).

O interesse pela aplicação das lacases na biotecnologia cresceu após a descoberta de sua habilidade em oxidar substratos com alto poder redox, na presença de mediadores. (BOURBONAIS & PAICE, 1990).

A lignina peroxidase (LIP) e a manganês peroxidase (MnP) foram descobertas em meados de 1980 e descritas como verdadeiras ligninases devido ao seu alto potencial redox (GOLD et al., 2000).

A LIP degrada unidades não fenólicas de lignina (90% do polímero), a MnP gera Mn^{3+} , que se difunde oxidando unidades de lignina fenólica ou não. (JENSER et al., 1996).

O papel da lacase na degradação da lignina ainda não está completamente elucidado, mas se sabe que esta degradação pode ocorrer mesmo na ausência de LIP e MnP (GARCIA, 2006) sabe-se também que ela está envolvida tanto na polimerização, quanto na despolimerização da lignina (THUSTON, 1994).

Entre os basidiomicetos, membros do gênero *Pycnoporus* têm se mostrado como produtores de várias enzimas com aplicações industriais como xilanase e β -glicosidase invertase e α -amilase (ESPOSITO et al., 1993).

O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo da família Polyporaceae que inclui *Phanaerochaete chrysosporium* bastante estudado pela produção de lacase, LIP e MnP, este fungo está amplamente distribuído no ambiente e é popularmente conhecido como orelha de pau, sendo encontrado em madeira onde se fixam e extraem nutrientes.

Dados da literatura mostram que este fungo é um eficiente produtor de lacase (HERPÖEL et al., 2000) produzindo também LIP e MnP quando em meio adequado (ESPOSITO et al., 1993).

Os tratamentos biológicos estão baseados na inoculação de microrganismos em substratos onde atuam degradando preferencialmente a lignina, sem provocar perdas consideráveis de celulose e hemicelulose. Estes tratamentos são ambientalmente seguros, pois não utilizam substâncias químicas (SCHIMIDT et al., 2003).

A hipótese de que o pré-tratamento fúngico seja benéfico em vários sentidos, baseia-se na possibilidade de redução do tempo de cozimento e conseqüentemente a energia requerida para polpação. A demanda química também pode ser reduzida devido à degradação prévia da lignina pelo fungo (SCOTT et al., 1995).

A polpação alcalina do tipo Kraft, ou sulfato e soda é um processo de cozimento dos cavacos de madeira na presença de um liquor composto principalmente por hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, que atuam promovendo a deslignificação pela reação de íons hidroxila e sulfeto de hidrogênio.

Este processo possui como vantagens a flexibilidade em relação à espécie de madeira, os ciclos de cozimento mais curtos que o processo sulfito ácido e a produção de pastas de alta resistência, mas necessita de altos investimentos para implantação sendo responsável pela emissão de gases de odor forte, produz polpas não branqueadas de baixa alvura, baixo rendimento, necessitando de um excesso grande de reagentes e agregando um custos com branqueamento (IPT, 1988)

A introdução de um tratamento pré-hidrólise por fungos lignolíticos pode agregar vantagens a esse processo reduzindo suas limitações. Porém a aplicação da biopolpação em escala industrial enfrenta dois obstáculos, a produção de inoculo em larga escala e o estabelecimento de tratamentos livres da ação de contaminantes.

As pastas produzidas na industria, para um determinado rendimento ou número Kappa, ou teor de lignina, são obtidas com controle de variáveis de cozimento (tempo, carga e concentração dos reagentes de sulfidez) (IPT, 1988).

Assim uma deslignificação prévia da madeira, reduz o número Kappa e, conseqüentemente, gera uma redução na quantidade de reagentes de sulfidez necessários para polpação, podendo reduzir o tempo de cozimento, melhorando a qualidade da polpa e reduzindo o consumo de energia e reagentes.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um tratamento prévio da madeira para biopolpação, através do fungo *Pycnoporus sanguineus*, comparando seu índice de degradação da lignina e sua sensibilidade aos contaminantes da madeira, com o fungo *Ceriporiopsis subvermispora*.

Material e métodos

Este experimento foi conduzido inicialmente no Laboratório Experimental de Micologia (LEMICO), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP) do Instituto de Biologia (IB), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde os cavacos de madeira foram biotratados, durante o período de 20 e 30 dias, respectivamente. Após este período as amostras foram analisadas no Laboratório de Celulose e Efluentes, LACE da Fundação Centro Federal de Educação Tecnológica, FunCEFET-RS.

Neste experimento foram utilizados um isolado de *Pycnoporus sanguineus* e um isolado de *Ceriporiopsis subvermispota* oriundo do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP. Repicados para meio BDA e cultivadas por 7 dias, sendo as placas cultivadas consideradas a matriz primária (fig. 1).

Para o preparo do inóculo utilizou-se serragem de *E. grandis* umedecida com 60% de água, e enriquecida com 10% (p/p) de farelo de trigo e 10% (p/p) de farelo de milho. Este substrato foi homogeneizado e colocado em frascos de vidro completando aproximadamente 80% do volume de cada frasco, sendo estes fechados com papel alumínio e filme de pvc e autoclavados a 120°C por 40 minutos.

Após a esterilização cada frasco recebeu um pedaço de micélio previamente crescido, ou seja uma pequena porção de matriz primária.

Os frascos inoculados com matriz primária de *Pycnoporus sanguineus* e *Ceriporiopsis subvermispota* foram mantidos em estufa a 25°C por 7 dias (fig. 1).

Amostras de cavaco de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Acacia mearnsii* De Wild. fornecidas pelo Laboratório de Celulose e Efluentes (LACE) do Centro Federal de Educação Tecnológica (CEFET-RS), foram mantidos imersos por 48h, após foram escorridos e transferidos para sacos plásticos, que foram fechados e submetidos a um tratamento térmico de 100°C por 40min.



Figura 1- Matriz primária e inoculo de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pycnoporus sanguineus*, respectivamente.

Após o tratamento térmico os cavacos foram retirados do saco e divididos em amostras de 200g adicionando-se 2% p/p de inoculo. A madeira com inoculo foi homogeneizada em bandejas plásticas e transferida para sacos plásticos menores sendo colocado um chumaço de algodão, para manter a aeração, na extremidade de cada saco que após serem amarrados foram incubados em estufa a 25°C por 20 e 30 dias.

Durante este período foram observados a presença de contaminantes e intensidade do micélio no substrato.

Amostras de 20 e 30 dias de desenvolvimento micelial, foram levadas ao LACE, onde foram lavadas em água corrente e secadas em estufa de aeração forçada a 75°C por aproximadamente 24h até peso constante. Parcelas de 50 gramas foram pesadas, excluindo-se partes com nós e casca, devido à alta concentração de lignina nestas estruturas.

Estas parcelas foram moídas em um moinho de facas (Fig. 2) e peneiradas em peneiras 40 e 60 MESH, respectivamente, aproveitando-se somente a porção de serragem intermediária as peneiras (Fig. 3)

A serragem foi envolvida por papel filtro (Fig. 3) e submetida à extração álcool tolueno 1:2 (Figura 3c) e água quente; respectivamente, a fim de eliminar gomas, substâncias pépticas, tanino, pigmentos, ceras, graxas, resinas e polifenóis que são

elementos extrativos que interferem na determinação de lignina total. Este procedimento seguiu a norma TAPPI 204 om 88 para determinação do teor de extrativos da madeira.



Figura 2- Moinho de facas.



Figura 3- Peneiramento, empacotamento e extração álcool- tolueno das amostras.

A umidade da madeira foi medida de acordo com as normas da NBR 14929 Madeira (ABNT, 2003).

Após extração dos interferentes determinou-se a lignina solúvel e insolúvel pelo método Lignina Klason descrito na norma TAPPI 222 om 88.

Resultados e Discussão

Os substratos formulados a partir de cavacos das duas madeiras *E. grandis* e *A. mearnsii*, depois de umedecidos, pasteurizados e inoculados com os dois tipos de fungos *P. sanguineus* e *C. subvermispora* apresentaram resultados de colonização diferentes entre si (tab. 1). Visualizou-se que a colonização tornou-se mais intensa com maior tempo de incubação para a espécie *P. sanguineus* enquanto para *C. subvermispora* não houve alteração entre 20 ou 30 dias de incubação. A colonização atingiu até 100% para os cavacos de *A. mearnsii* e 50% para *E. grandis* pelo *P. sanguineus*. Para o *E. grandis*, o máximo atingido foi uma colonização de 50% pelo *P. sanguineus*. Este aspecto foi de extrema importância, visto que o principal problema indicado na pesquisa é a baixa colonização do substrato.

Os trabalhos sobre biopolpação utilizam, em grande parte, inóculos produzidos em meio líquido, dificultando a manipulação bem como o micélio exposto torna-se mais frágil. Segundo Griffin (1994) o meio sólido pode ser considerado mais natural, uma vez que os fungos, na natureza desenvolvem-se em substratos sólidos. Considerando isto, no momento que o fungo já se desenvolve no substrato similar ao que será posteriormente transferido, o sistema enzimático já estará ativo. Com a inoculação utilizando a produção de matriz secundária e inóculo formulados com a serragem da respectiva madeira, este se torna mais adaptado à colonização e resistente às condições adversas. Como a serragem é um subproduto de baixo custo, sua utilização para produção de inóculo pode aumentar a viabilidade da biopolpação, em escala industrial. Conforme visto, apenas 2% de inóculo foi capaz de colonizar as amostras de cavacos de forma homogênea em 30 dias.

Neste experimento verificou-se também que os resultados obtidos no experimento 2 (velocidade de crescimento miceliano em meio estéril), indica relações aos resultados encontrados neste experimento. Quando a colonização do substrato ocorreu de forma rápida, não permitiu o desenvolvimento de outros fungos na condição de contaminantes. Sendo assim, os cavacos de *A. mearnsii* foram os únicos que não indicaram sinais de crescimento de contaminantes quando foi colonizado pelo *P. sanguineus* (tab 2).

Tabela 1- Índice de colonização (porcentagem) de *Pycnoporus sanguineus* e *Ceriporiopsis subvermispora* em cavacos de *A. mearnsii* e *E. grandis*, aos 20 e 30 dias de incubação.

Período de tratamento (dias)	Colonização do substrato %			
	<i>A. mearnsii</i>		<i>E. grandis</i>	
	CS	PS	CS	PS
20 dias	<50%	<75%	<25%	25%
30 dias	50%	100%	25%	<50%

Tabela 2- Presença de contaminação aos 20 e 30 dias de incubação.

<i>Presença/ ausência de contaminações</i>			
<i>A. mearnsii</i>		<i>Eucalipto</i>	
CS	PS	CS	PS
Presente	Presente	Presente	Presente
Presente	Ausente	Presente	Presente

O fungo *P. sanguineus* apresentou uma maior densidade miceliana no substrato *A. mearnsii* do que os demais tratamentos, observados através da intensidade do micélio, tornando inclusive os cavacos mais claros e mantendo estas características por mais tempo que os demais (fig. 4).



Figura 4- Cavacos de madeira submetidos ao biotratamento por 30 dias, A/CS= *Acacia mearnsii* inoculado por *C. subvermispora*; E/CS= *Eucalyptus grandis* inoculado por *C. subvermispora*; A/PS= *Acacia mearnsii* inoculada com *P. sanguineus*; E/PS= *Eucalyptus grandis* inoculado com *P. sanguineus*.

A presença de fungos contaminantes ou competidores foi verificado em quase todas as repetições. O comportamento dos isolados frente a estas contaminações foi também observado, onde o isolado de *P. sanguineus* demonstrou ser mais competitivo frente aos contaminantes, pois, enquanto o isolado de *Ceriporiopsis subvermispora*, praticamente não se desenvolveu nas áreas contaminadas, o isolado de *P. sanguineus* completou a colonização em todas as repetições, uniformemente, aos 30 dias de cultivo. Neste sentido, os resultados obtidos com o isolado *P. sanguineus* demonstram a possibilidade de superação de dois fatores limitantes à biopolpação: a produção de inóculo em larga escala e a possibilidade de aumento na eficiência pela menor ocorrência de contaminação por fungos competidores.

Na tab. 3, os tratamentos controle foram os que não receberam o inóculo, sendo identificadas como *Acacia mearnsii* e *Eucalyptus grandis*, sendo utilizadas como referência para o cálculo da lignina degradada. Nos resultados obtidos em relação a biopolpação, após 20 dias de tratamento dos cavacos de *A. mearnsii*, observou-se uma perda considerável de lignina. A degradação deste componente foi mais intensa no tratamento por *P. sanguineus*, porém alguns tratamentos apresentaram resultados negativos, com um aumento da porcentagem em peso da lignina após a determinação.

Tabela 3- Porcentagem de lignina total e porcentagem de lignina total degradada, após vinte e trinta dias de tratamento.

Tratamento*	Lignina total %(p/p)	Lignina degradada %(p/p)
<i>A. mearnsii</i>	26,51	0
<i>E. grandis</i>	24,58	0
Cs/E/20d	27,69	-3,11
Ps/E/20d	26,14	-1,46
Cs/A/20d	25,17	1,34
Ps/A/20d	23,85	2,67
Cs/ E/30d	25,28	-0,7
Ps/E/30d	20,73	3,85
Cs/A/30d	21,34	5,18
Ps/A/30d	27,47	-0,96

CS= *Ceriporiopsis subvermispora*, PS= *Pycnoporus sanguineus*, A= *A. mearnsii mearnsii* E= *Eucalyptus grandis*.

O aumento da porcentagem de lignina não foi descrito nos trabalhos sobre biopolpação pelo fungo *C. subvermispora*, sendo pouco provável a ocorrência de uma degradação da celulose e, conseqüente aumento da porcentagem em peso da lignina.

Como qualquer determinação gravimétrica, a determinação da lignina está sujeita as diversas interferências operacionais, como os relativos ao preparo da amostra que são as causas mais prováveis para as interferências encontradas. Visto que a presença de estruturas como nó e casca da madeira gera um erro altamente significativo devido a maior concentração de lignina nestas estruturas.

Conclusões

- *Pycnoporus sanguineus* é mais competitivo em relação à colonização do substrato.
- O uso de inóculo sólido feito com serragem como substrato favorece a colonização dos cavacos de madeira para a biopolpação.
- Apesar dos resultados promissores da biopolpação do *Pycnoporus sanguineus* especialmente sobre os cavacos de *A. mearnsii* não se pode afirmar seu efeito devido as possíveis interferências existentes na metodologia de determinação da lignina degradada.

Referências

- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas **NBR 14929 Madeira** - Determinação do teor de umidade de cavacos - Método por secagem em estufa. 2003, 3 p.
- ADASKAVEG, J. E. & GILBERTSON, R. L., In vitro decay by the white rot fungi *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. **Canadian journal of botany** , v.64, p. 1611- 1619,1986.
- AKHTAR, M.,Biomechanical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*, **Holzfoschung**,v.75, n.2, 1992.
- AKHTAR, M., et al. Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*.**Tappi journal**, v.75, p.105-109, 1992.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERS, G.; KIRK, K. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R. A., AKHTAR, M., editors, **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**, New York: Wiley; 1998, p. 309-383.
- BLANCHETTE, R. A. et al. Changes in structural and chemical componentes of wood delignified by fungi. **Wood Science Technology** , v.19, p.35-46,1985.
- BLANCHETTE, R. A. et al. Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. **Holzforchung** (Walter de Gruyter, Berlin), v. 46, p.109-115, 1992.
- BLANCHETTE, R. A. et al. Selection of whit-rot fungi for biopulping. **Biomass**, England, v.15, p 93-101, Elsiever Applied Science Publishers Ltd. 1988.
- BLANCHETTE, R. A. et al. Seletive delignification of lasterns hemlock by *Ganoderma tsugae*. **Phytopathology**, v.74, p. 153-160, 1984.
- BOURBONAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates na expanded role for laccase in lignin degradation. **FEBS Letters**, v.267, p.99-102, 1990.
- BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, IV, 2004, Rio Claro, SP. **Anais do...** Rio Claro: Faculdades integradas Claretianas, p.1-6, 2004.
- CAPELARI, M. **Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: *Pleorotus* spp. E *Agrocybe perfecta* (Rick) Sing.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. Tese (Doutorado em Botânica) Universidade de São Paulo, 154p. 1996.
- DONG, J. L. et al. Influence of culture conditions on laccase productions and isoenzyme patterns in the with rot fungus *Tramedes gallica*. **Basic Microbiology**, v. 45, n.3, p. 190-198, 2005.
- DONINI, L. P. Cultivo de Shimeji [*Pleorutus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer] em Capim– elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) suplementado com farelos. 2006, 80p., Dissertação (Programa de Pós graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- EGGERT, C., TEMP, U., DEAN, J.F.D. & ERIKSSON, K. E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccasse. **FEBS Letters**, v. 391, p.144-148, 1996.

ESPOSITO et al. N phenoloxidasas and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain) applications. **Journal of Biotechnology**, n.29, p.219-228, 1993.

ERIKSSON, K. E. L., BLANCHETTE, R. A., ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood componentes**. Springer- Verlag, Berlin, 1990. 407 p.

ERIKSSON, K. E. & KIRK, T. K. Biopulping, biobleaching effluents with white-rot fungi. In: **Cromprehensive Biotechnology**. Toronto: Pergamon Press, 1985. p. 271-294.

FENGEL, D. & WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions..** Berlín: Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FERRAZ, A.; MASARIN, F.; VICENTIN, M. P.; PAVAN, P. C. Aplicações da biodegradação de madeira por Basidiomycetes na produção de celulose e papel. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 57, 2006, Gramado, **anais do...** Porto Alegre: Sociedade Botânica do Brasil, 2006, p.244-247.

FERRAZ, A. GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; PAVAN, P. C. Biomechanical pulping of *Eucalyptus* wood chips. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v.7, 2005.

FISCHER, K. et al. Rreduction of Resin Content in Wood chips during experimental biological pulping processes. **Holzforschung** (Walter de Gruyter, Berlin), v.48, n.4, pp 285-290, 1994.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. Tese (Programa de pós graduação em biologia celular), Universidade Nacional de Brasília, Brasília DF.

GOLD, M.H.; YOUNGS, H.L.; GELPKE, M.D. manganese peroxidase. **Metal ions in biological systems**, v.37, p.559-586, 2000.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2 ed. New york: Wiley Lis, 1994, 458p.

Guerra, A.; PAVAN, P. C.; FERRAZ, A. Bleaching, brightness stability and chemical characteristics of *Eucalyptus grandis* bio TMP pulps prepared in a biopulp pilot plant. **Appita Journal**, v. 59, n. 5, p. 412415, 2006.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A.; LU, F.; RALPH, J. Structural characterization during *Pinus taeda* woos treatmente with *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4073-4078, julho de 2004.

HATVANI, n. & MECS, I., Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* and solid medium. **Enzime and Microbial Technology**, n. 30, p. 381-386, 2002.

HERPÖEL, I. Et al. Selectionof *Pycnoporus cinnabarius* strains for laccase production. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, n.2, p.301-306, 2000.

IPT- Instituto de Pesquisas Tecnológicas do estado de São Paulo. **Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. 2ed., v. 1, Escola Senai, São Paulo: 1988.

JENSEN, K. A. Jr; BAO, W.; KAWAI, S.; SREBOTNIK, E.; HAMMEL, K. E. manganese dependent cleavage of nonfhenolic lignin structures by *Ceriporopsis subvermispota* in the absence of lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3679-3686, 1996.

KARUNANANDAA, K. & VARGA, G. A. Colonization of crop residues by White rot fungi: cell wall monosaccharides, phenolic acids, ruminal fermentation characteristics and digestibility of cell wall fiber componentes in vitro. **Animal feed Science Technology**. v.63, p.273-288, 1996.

KIRK, T.K. & Farrel, R.L. Enzymatic "combustion"- The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.465-505, 1987.

KIRK, T.K. & HIGHLEY, T. L., Quantitative changes in structural components of conifer woods during decay by white and brown- rot fungi. **Phytopathology**, v.63, p.1338-1342, 1973.

KIRK, T. K., JEFFRIES, T. W. & LEATHAM, G. F. Biotechnology: applications and implications for the pulp and paper industry. **Tappi Journal**, v.66, p.45-51, 1983.

LEATHAM, G. F. & KIRK, T.K. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in White rot basidiomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v.16, p.65-67, 1983.

LEE, K. H. et al. Micromorphological characteristics of decay wood and laccase produced by brown rot fungus *Coniophora puteana*. **Wood science journal**, v.50, p.281-284, 2004.

LOMASCOLO, A. et al. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarius* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.618-624, 2003.

MARDONES, L. et al. Kraft pulping of *Eucalyptus nitens* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.81, n.4, p.608 -613, 2006.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v.8, p.195-204, 2005.

MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. Laccase new functions for old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MATA, G.; DELPECH, P.; SAVOIC, J. M. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on wheat straw. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 118-122, 2001.

MENDONÇA, R. M. T. **Avaliação de um pré-tratamento biológico (biopolpação) para a obtenção de polpas químicas de alto rendimento**. 2002. 147p. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sao Paulo, São Paulo.

MENDONÇA, R.; FERRAZ, A.; KORDSACHIA, O.; KOCH, G. Cellular UV-microspectrophotometric investigations on pine wood (*Pinus taeda* and *Pinus elliottii*) delignification during biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilbn. & Ryv. and alkaline sulfite/anthraquinone tr. **Wood science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 567-575, 2004.

MESQUITA, J. B., LIMA, J. T.; TRUGILHO, P. F. Microbiota associada à madeira serrada de *Eucalyptus grandis* durante a secagem ao ar livre. **Ciência Florestal** (Santa Maria, RS), v.16, p. 45-50, 2006.

MESSNER K., MASEK, S., SREBOTNIK, E. e TCHT, G. Fungal pretreatment of aspen chips improves strength of refiner mechanical pulp. **Tappi Journal**, v. 71, p. 105-108, 1992.

MORAIS, R. L. C.; BENACHOUR, M.; DUARTE-COELHO, A. C. **Estudo Da Caracterização Reológica Do Licor Negro Do Processo Soda/Bambusa vulgaris Schrad E Do Efeito Da Adição Do Peróxido De Hidrogênio**. Disponível em: < <http://ciadicyp.unam.edu.ar/trabajos/trabajos/varios/Coelho-78-UFP-Br.pdf> > acesso em janeiro de 2007

ORIRAN, T. P., LABOSKY Jr. & BLANKENHORN, P. R. Kraft pulping and paper making properties of *Phanerochaete chrysosporium* degraded red oak. **Wood Fibres science**, v.23, p.316-327, 1991.

ORIRAN, T. P., LABOSKY Jr. & BLANKENHORN, P. R. Kraft pulping and paper making properties of *Phanerochaete chrysosporium* degraded aspen. **Tappi Journal**, v.73, p.147-152, 1990.

OTJEN, L. & BLANCHETTE, R. A. Seletive delignification of birch wood (*Betula papyrifera*) by *Hirshioporus pargamensis* in the field and laboratory. **Holzforchung**, v. 40, p. 1989- 190, 1986.

OTJEN et al. Assessment of 30 white rot Basidiomycetes for selective lignin degradation. **Holzforchung**, v. 41, p.343-349, 1987.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v. 212, p. 834-339, 2000.

REZENDE, A. A. P.; MATOS, A. T.; SILVA, C., M. Utilização do efluente de Indústria de celulose e papel em irrigação – Uma revisão. In: Congresso Internacional de Celulose e Papel, 2000, São Paulo, **anais do...**, São Paulo: ABTCP- TAPPI, 2000, p.1-12.

SCHARZE, F., ENGEL, S.J. & MATTHEC, K. C. **Fungal strategies of decay trees**. Berlin: Springer, 2000, 185p.

SCHIMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S. e VARGAS Jr, F. M. Tratamento do feno de Braquiária pelo fungo *Pleorotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1866-1871, 2003.

SILVA, M. L. C. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v.29, n.1, p.85-92, 2006.

SCOTT, G. M., AKHTAR, M.; LENTZ, M. Fungal pretreatment of wood chips for sulfite pulping. In: Proceeding of the 1995 TAPPI pulping conference, **anais do...**, book1, Atlanta, GA: TAPPI Press, october 1995. p.355-361

SCOTT, G. M. **Enhancing mechanical pulping with fungal pretreatment in the wood yard** Disponível em: <http://www.esf.edu/ce/conferences/Cell_pdf/Scott.PDF> Acesso em 18 de Julho de 2007.

TAPPI- Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **Test Methods 1996 – 1997**. Tappi Press, Atlanta, EUA: 1996, 961p.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A. A. **SANEST- Sistema de Análise estatística para microcomputadores**. Registrado na secretaria Especial de Informática sob n° 066060- categoria ^a Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas, 1994.