



OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA

Francisca da Silva Ferreira¹

Ieda Hortencio Batista²

Amilcar da Silva Ferreira³

Carlossandro Carvalho de Albuquerque⁴

Ademir Castro e Silva⁵

Resumo

Este trabalho trata do estudo sobre fatores que podem influenciar o crescimento dos fungos *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr e *Trametes sp.* Os fungos foram coletados no perímetro urbano de Manaus-AM e município de Manacapuru-AM. Para estudo da otimização do crescimento foram analisados os seguintes parâmetros: pH, temperatura e fontes de nitrogênio (NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em diferentes concentrações). A avaliação do crescimento foi realizada através de mensuração do avanço linear da fronteira micelial em meio sólido de ágar-extrato de malte. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os fungos apresentaram crescimento ótimo no pH entre a faixa de 5-6 e temperatura entre 30-35 °C. Também foi observado que o crescimento dos fungos nas diferentes fontes de nitrogênio não se mostrou significativo ao nível de 95% de probabilidade. Entretanto, em valores absolutos o maior crescimento ocorreu na concentração de 30 mEq./L de nitrato de sódio. O presente estudo permite avançar em novas pesquisas uma vez que foi possível identificar as faixas ótimas de pH, temperatura e fonte de Nitrogênio para o crescimento micelial.

Palavras-chave: Fungos degradadores; madeira; Amazônia.

Abstract

This paper concerns to factors that might has influence on growth and ligninolytic activity of *Pycnoporus sanguineus* (L.:F.) Murr and *Trametes sp* fungi. Fruit bodies were collected at urban perimeter of municipalities Manaus and Manacapuru, State of Amazonas, Brazil. To study growth optimal conditions the following parameters were analyzed: pH, temperature and nitrogen sources (NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on different concentrations). Growth rate avaluation was done through measurement of micelial growth in solid media extract of malte. The results shown the pH 5-6 optimal for both fungi while temperature optima in the range 30-35 °C. Growth in different nitrogen sources didn't shown significative at 95% level of probability. However, absolute values were highest at 30 mEq/ML

¹ Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT-UEA. Professora da Universidade do Estado do Amazonas, Curso de Ciências Biológicas, ENS/UEA. fransferreiraeua@gmail.com

² Doutora em Biotecnologia – UFAM. Professora da Universidade do Estado do Amazonas, Curso de Ciências Biológicas, ENS/UEA. iedahbatista@gmail.com

³ Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT-UEA. Professor da Secretaria da Educação e Qualidade de Ensino – SEDUC/ AM. prof.amilcar@yahoo.com.br

⁴ Doutor em Geografia – UFC. Professor da Universidade do Estado do Amazonas, Curso de Geografia, ENS/UEA. carlossandro.albuquerque@gmail.com

⁵ Doutor em Ciências Biológicas. Professor do curso de Engenharia Florestal, Centro de Estudos Superiores de Itacoatiara CESIT/UEA. adcastro-mao@hotmail.com



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

concentration of sodium nitrate. This study allows us to move into new research as it was possible to identify the optimum ranges of pH, temperature and nitrogen source for mycelial growth.

Keywords: Degradation fungi; wood; Amazon.

Introdução

O interesse do homem pelos fungos vem desde a antiguidade em função da eterna busca por alimento. Logo se descobriu que eles eram uma nova fonte de alimentação, porém vários envenenamentos acidentais ocorreram e estes fungos venenosos receberam o nome de “fermentos venenoso da terra” (MORAIS et al., 2003). Muitos fungos já eram empregados desde a mais longínqua antiguidade, quando o homem descobriu a metodologia e técnica de preparo do pão, do queijo e das bebidas. Na época, ignorando o que provocava a fermentação, pelo menos o pão e as bebidas alcoólicas surgiram praticamente em todos os cantos do planeta independentemente. Durante centenas de anos, várias tribos indígenas aprenderam com a natureza que determinadas espécies de fungos eram comestíveis, e de excelente valor nutritivo. Europeus e asiáticos ainda hoje mantêm cogumelos em suas dietas, especialmente porque a ciência tem descoberto qualidades ignoradas por tanto tempo e que existem na maioria dos demais alimentos tais como: baixam o nível de colesterol no sangue, têm substâncias anticancerígenas, são fontes de aminoácidos (essenciais e não essenciais), contêm minerais como o cálcio, potássio, iodo e fósforo, contêm várias vitaminas, nutrem e não engordam (PUTZKE, 2004).

Atualmente várias espécies de fungos são usadas em diversos tipos de indústria (alimentícia, farmacêutica, etc). Os cogumelos das espécies *Agaricus campestris*, *Morchella hortenoi*, *Clavaria fava*, *Pleurotis* sp. *Boletus* sp. e as trufas do gênero *Tuber* sp., são os mais frequentemente utilizados como alimentos. As espécies de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* e *Penicillium gordonzola* podem ser utilizados no preparo de queijos. Dentre as leveduras de maior importância industrial destacam-se as linhagens fermentativas de *Saccharomyces*, empregadas na indústria de panificação, e bebidas alcoólicas: Cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis*), rum, vinho (*Saccharomyces ellipsoideus*), saquê e produção industrial do etanol a partir da cana de açúcar (NEUFELD, 1997).



Com o avanço dos estudos na área biotecnológica os organismos fúngicos tornaram-se de grande interesse e vêm contribuindo com produtos e processos de importância industrial. Na maioria das vezes, eles são vistos pela população como prejudiciais, uma imagem que é dada pelas poucas espécies dentro do reino que causam as micoses do homem e animais ou as que são responsáveis por doenças em plantas cultivadas. Muitas pessoas associam os fungos com os bolores ou mofos que invadem paredes úmidas das residências, artigos de couro ou ainda cobrem os alimentos, como frutas e grãos armazenados. Algumas espécies de fungos podem ainda ser associadas à culinária, como é o caso dos cogumelos (AZEVEDO, 2003).

Os fungos têm grande importância agrícola e ecológica, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas e na simbiose com as plantas. Devido a sua versatilidade, os fungos vêm sendo estudados, principalmente quanto à sua aplicabilidade biotecnológica (AZEVEDO, 2003; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

A produção de moléculas com atividade farmacológica é uma das mais exploradas em biotecnologia, por empresas de países industrializados. Os antibióticos são os produtos microbianos tradicionalmente mais explorados nesta área, contudo novos compostos têm sido investigados em escala de screening farmacológico industrial, como agentes antitumorais e anti-câncer, inibidores enzimáticos e agentes cardiovasculares. A aplicação de microrganismos na produção de fármacos teve um desenvolvimento acelerado a partir da descoberta dos antibióticos, na década de 30. A produção de penicilina de *Penicillium notatum* ou o *Penicillium chrysogenum*, revolucionou toda a terapêutica antimicrobiana, possibilitando a descoberta de outras drogas desse tipo, algumas com especificidade para fungos, bactérias, protozoários, etc. (LACAZ, 2002).

Fungos deterioradores de madeira

Dentre os vários potenciais biotecnológicos dos fungos ressalta-se o poder de degradação da matéria orgânica. Os fungos são capazes de atacar e degradar a madeira, em seus ecossistemas terrestres naturais e especialmente os da classe Basidiomycetes tem demonstrado maior eficiência no processo de biodegradação de material lignocelulósicos (HATAKKA, 1994; HIGUCHI 1990, Apud SOARES, 1998). Estes fungos podem ser saprófitas, parasitas, simbióticos e micorrízicos, sendo usados na indústria alimentícia, na produção de enzimas, na



biopolpação, no biobranqueamento de efluentes, na formação de ectomicorrizas, etc. (HAMLYN et al.,1998).

Hoje, acredita-se que existam mais de 200.000 espécies de Basidiomicetos ligninocelulósicos, a maioria dos quais estariam nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os basidiomicetos lignocelulósicos estão classificados em duas grandes ordens dos basidiomycetes: *Agaricales* e *Aphylllophorales*. Estes apresentam tamanhos, formas, cores, e consistências diversificadas, podem ser microscópicos ou ter até 20cm de diâmetro, presos ao substrato através de estirpe, sésseis ou na forma de manchas regulares ou irregulares na superfície da madeira. São versáteis e, num mesmo tronco, uma espécie pode apresentar mais de uma forma ou cor. Crescem inicialmente dentro da madeira colonizando-a e suas hifas formam uma rede, nem sempre visível a olho nu, mais ou menos extenso, preenchendo o lume das células, passando de uma célula a outra através da parede celular e em alguns casos destruindo a estrutura da lamela média. Após certo período de tempo, que pode durar uns poucos dias até muitos anos, variável de espécie para espécie e com as condições ambientais, emergem os basidiocarpos (corpos de frutificação). São extremamente importantes como decompositores e principais responsáveis pela ciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam os componentes da madeira: celulose, hemicelulose e lignina, a partir dos quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução (BONONI, 1997).

Estudos da biodiversidade, visando espécies com potencial biotecnológico, provavelmente poderão contribuir com descoberta de metabólicos importantes que podem contribuir com a melhoria da qualidade de vida da população. No entanto, faz-se necessário maior investimento em pesquisas científicas e tecnológicas, a fim de que esse potencial seja melhor explorado, pela indústria, alimentícia, farmacológica, entre outras.

Materiais e métodos

Coleta dos Fungos

Os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp* com seus respectivos substratos foram coletados na BR 174 Km 41 (Amazonas) e no perímetro urbano no Município de Manacapuru nos meses de fevereiro - maio e acondicionados em sacos de papel com as devidas informações sobre local, data de coleta, coletor e tipo de substrato. Em seguida foram levados ao Laboratório



de Microbiologia da UTAM/EST-UEA, onde foram armazenados em câmara de refrigeração científica em temperatura de 3.5°C (INDREL RC 1500 D). No dia seguinte após a coleta, os fungos foram inoculados em meio de cultura para em seguida serem identificados e utilizados na pesquisa em questão.

Isolamento dos fungos

Utilizando-se um uma lamina de bisturi, foi retirado de cada carpóforo cerca de 3mm de uma de suas extremidades. A amostra do fungo foi submetida à assepsia em álcool a 70%, hipoclorito a 3% e água destilada, por um período de 1–2 minutos em cada solução. Em seguida cada amostra foi colocada sobre filtro de papel para retirar o excesso de líquido presente. Posteriormente cada fragmento fúngico foi inoculado no centro de cada placa de Petri, com o meio de cultura ágar-extrato de malte no interior da Câmara de Fluxo Laminar. As placas de Petri foram identificadas, lacradas com fita plástica (Parafilm “M”) e deixadas em temperatura ambiente 28° C (\pm 2°C) por um período de sete dias. Decorrido esse período, foi realizada a replicagem no mesmo tipo de meio para a obtenção de uma cultura pura, sendo que a cultura de *Trametes sp* foi identificada com o código FSF11 e o *P. Sanguineus* com o código PIC07. As duas culturas foram depositadas em câmara de refrigeração científica (INDREL RC 1500 D) em temperatura de 3.5°C.

Otimização das Condições de Crescimento do Fungo - Temperatura

No estudo do crescimento dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp*, foi utilizado o método da placa de Petri em triplicata, no qual o avanço da fronteira micelial foi medido em função do tempo.

Para o estudo sobre a influência da temperatura no crescimento micelial, foi retirado da periferia da cultura pura cerca de 5mm do micélio de *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp* os quais foram inoculados em placas de Petri (triplicata) contendo meio Ágar-malte (2%). Estas culturas foram mantidas em incubadoras com temperaturas pré-estabelecidas de 25°, 31° e 35° C e em temperatura ambiente de 28°C (\pm 2°C). O crescimento foi mensurado através da



progressão linear da fronteira micelial, sendo as medidas tomadas em duas direções a cada 24 horas, durante 12 dias. A mensuração do raio dessa colônia permite avaliar o crescimento micelial, o qual ocorre pela extensão da ponta da hifa, enquanto que as partes mais antigas das hifas são incapazes de crescimento. Embora a hifa mais antiga não seja capaz de crescer, tem um importante papel de suportar o crescimento da ponta à medida que novo protoplasma é formado através da hifa e transportado para a ponta pela corrente citoplasmática ativa (MOORE-LANDECKER, 1982).

Otimização do pH

Cada fungo foi inoculado em placa de Petri (triplicata) contendo o meio ágar-extrato de malte. O pH do meio foi ajustado para a faixa de 4,0 – 7,0 utilizando-se para cada caso NaOH 1,0 M ou H₂SO₄ 1,0 M. Para evitar a degradação do ágar abaixo do pH 5,0 o ajuste foi realizado após a autoclavagem. Procedida à inoculação, as culturas foram mantidas em incubadora a 31° C, durante 12 dias. Assim como realizado para a temperatura, o avanço da fronteira micelial foi mensurado em duas direções a cada 24 horas, no período de 12 dias.

Fonte de Nitrogênio

No estudo da fonte de nitrogênio mais adequada ao crescimento de *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp utilizamos nitrato de sódio (NaNO₃) e sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄), as quais foram adicionadas ao meio ágar-malte nas concentrações de 30mEq/L, 60mEq/L, 90mEq/L, 120mEq/L e 150mEq/L (fonte de nitrogênio na forma de NO₃⁻ ou NH₄⁺, MMNO₃⁻ e MMNH₄⁺ respectivamente), acrescidos de 2% de glicose como fonte de carbono. Após a inoculação de cerca de 5mm do micélio de cultura pura, as placas foram lacradas, identificadas e mantidas em temperatura ambiente em torno de 28°C durante 12 dias. O experimento foi realizado em triplicata para cada concentração e também para a testemunha. O avanço da fronteira micelial foi mensurado diariamente no período de 12 dias.

Taxa de Crescimento dos Fungos e Análise Estatística



A taxa de crescimento foi definida como a razão entre a média da progressão da fronteira micelial e o número de dias de crescimento do fungo. Para a análise estatística dos dados utilizou-se o software STATISTICA 6.0, onde se obteve os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) dos dados, teste de correlação entre as variáveis, e o teste ANOVA e de Tukey para contrastes das médias.

Resultados

Velocidade de crescimento em função do tempo e Taxa de crescimento micelial

O avanço da fronteira micelial apresentou uma melhor resposta linear de crescimento em função do tempo, entre 24 e 108 horas, e entre temperaturas de 25°C a 31°C em pH 5,2. Assim, a velocidade de crescimento fúngico foi obtida em função da inclinação da reta no intervalo de tempo mencionado. O crescimento é restrito à extremidade da hifa, a qual cresce mais ou menos a uma taxa linear constante e, portanto, aumenta a margem da colônia a uma taxa linear (MOORE-LANDECKER, 1982). No presente estudo a taxa de crescimento micelial apresenta-se diferentes para as temperaturas testadas (Figura 1).

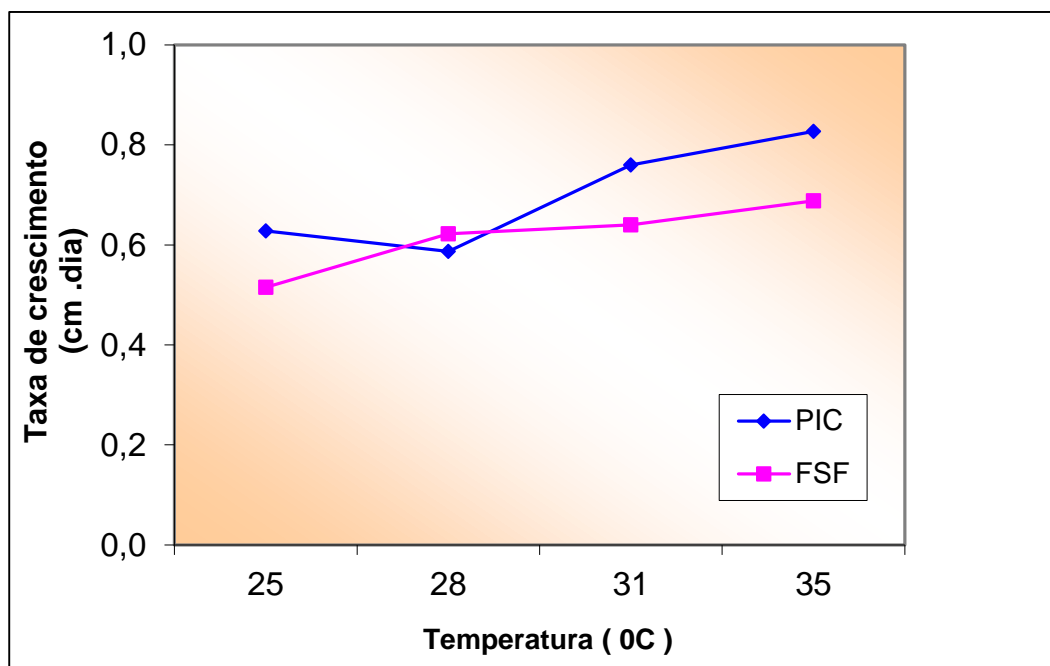


Figura 1. Taxa de crescimento dos fungos mensuradas no período de uma semana em diferentes temperaturas.



Em geral, o fungo *P. sanguineus* apresentou uma taxa de crescimento média maior do que o fungo *Trametes* sp (Figura 1). Ambos os fungos apresentaram maior taxa de crescimento na faixa de temperatura entre 31-35°C e a menor em 25°C. Verifica-se uma relação positiva entre a taxa de crescimento e a temperatura, onde à medida que a temperatura aumenta ocorre um aumento na taxa de crescimento, com exceção para o *P. sanguineus* que mostrou um pequeno decréscimo na taxa de crescimento inicial na temperatura de 28 °C.

Influência do pH no crescimento micelial dos fungos

Os fungos apresentaram um bom crescimento na faixa de pH considerada (pH 4–7). No caso do *Pycnoporus sanguineus* o maior crescimento médio, em termos absolutos, ocorreu no pH 5 e o menor no pH 4 (Tabela 01). O mesmo padrão ocorreu para *Trametes* sp sendo que neste caso o valor médio absoluto para o menor crescimento foi inferior àquele do *P. sanguineus*.

Tabela 01. Influência do pH no crescimento micelial dos fungos.

FUNGO	pH	Cresc. micelial (cm)		
		(Média)	Variância	Desvio Padrão
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4	5.01	5.023	2.24
	5	6.90	5.747	2.39
	6	6.88	6.104	2.47
	7	6.64	6.026	2.45
<i>Trametes</i> sp	4	4.56	3.645	1.90
	5	6.53	5.777	2.40
	6	6.35	6.225	2.49
	7	6.28	6.425	2.53



A Análise de variância para determinar se existe diferença significativa no crescimento micelial entre os diferentes pHs (pH 4-6) evidenciou que ao nível de 95% de probabilidade existe diferença entre as médias obtidas (Tabela 02). Ou seja, o crescimento micelial, medido pela progressão linear do avanço da fronteira micelial, não é o mesmo. Teste de Tukey para comparação entre duas médias mostrou diferença significativa no valor médio de crescimento para o pH4.

Tabela 02. Análise de Variância do efeito do pH no crescimento micelial do *Pycnoporus sanguineus*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	2	37,8295	18,9147	3,3615	0,043589*
Dentro de Tratamentos	45	253,2061	5,6268		
TOTAL	47	291,0356			

* significativo ao nível $\alpha=0,05$

Por outro lado, quando se faz uma análise de variância em que se agrupam todos os pHs (4-7), o teste não detectou nenhuma diferença estatística. Em todos os pHs existe uma relação linear da progressão da fronteira micelial em função do tempo de crescimento do fungo. De modo geral, existe um forte coeficiente de correlação em torno de $r=0,98$ a $r=0,99$ para todos os pHs.

A Análise de variância realizada com valores de crescimento micelial de *Trametes sp* obtidos na faixa de pH 4-6, para se verificar a existência de diferenças significativas entre as médias desses dados, mostrou que ao nível de 95% de probabilidade existe diferença entre elas (Tabela 03).

Tabela 03. Análise de Variância do efeito do pH no crescimento micelial do *Trametes sp*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	2	40,3229	20,1614	3,8651	0,0282*



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Dentro de Tratamentos	45	234,7318	5,2162
TOTAL	47	275,0547	

* significativo ao nível $\alpha= 0,05$ ($p < 0,05$ significativo)

A diferença no valor médio de crescimento micelial entre o pH mínimo (pH 4) e máximo (pH 7) testado é de aproximadamente 37,73%.

Teste de Tukey para comparação de duas médias mostrou que o crescimento obtido no pH 4 é significativo em relação aos outros pHs (Tabela 04). Ou seja, o crescimento do fungo *Trametes* sp em meio de cultura ágar - malte e pH 4 é menor.

Tabela 04. Teste de Tukey para crescimento micelial do *Trametes* sp em três pH.

	{1} pH4 M=4,5062	{2} pH5 M=6,5375	{3} pH6 M=6,3500
G_1:1 {1}		0.040475971	0.068617939
G_2:2 {2}	0.040475971		0.97080951
G_3:3 {3}	0.068617939	0.97080951	

* números em negrito indicam significância a 95% de probabilidade.

Portanto, ambos os fungos apresentaram o menor avanço da fronteira micelial, no pH 4. Tanto para *Pycnoporus sanguineus* como *Trametes* sp a faixa de pH 5 -7 é satisfatória para crescimento no meio ágar-malte (figuras 2 e 3).

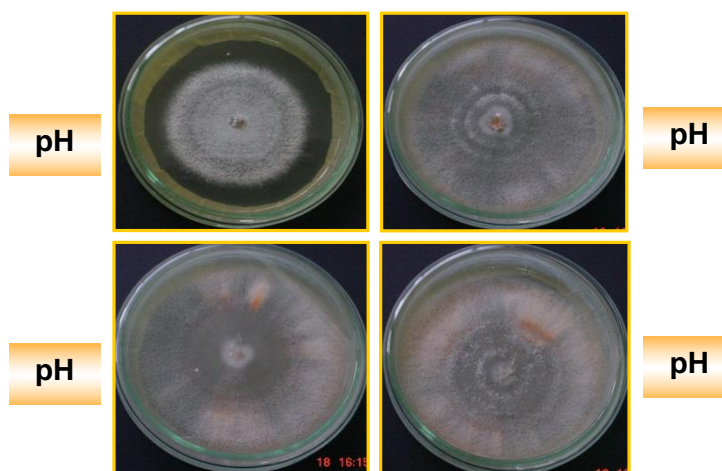




Figura 2. Crescimento micelial de *P. sanguineus* em meio ágar malte.

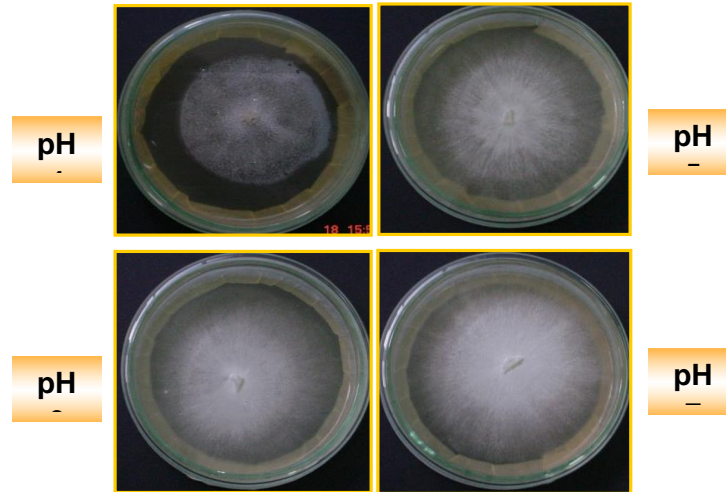


Figura 3. Crescimento micelial de *Trametes* sp em meio ágar malte.

Concentração de Nitrogênio

A tabela 05 mostra os valores médios da progressão da fronteira micelial para *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp nas diferentes concentrações de nitrato de sódio (NS) e sulfato de amônia (SA). No geral, verifica-se para *P. sanguineus* que a média do crescimento micelial, definido como a progressão linear do micélio, foi similar para todas as fontes de nitrogênio testadas, notadamente para o nitrato de sódio.

Tabela 05. Parâmetros descritivos da progressão da fronteira micelial do *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp em diferentes concentrações de nitrogênio

FUNGO	Fonte Nitrogênio	Conc. N (mEq./L)	Cresc. micelial (cm) (média)	Variância	Desvio Padrão
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Nitrato de Sódio	30	5.37	8.7183	2.9527
		60	4.98	8.0713	2.8410



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

	90	4.91	8.0969	2.8455
	120	5.38	9.7654	3.1250
	150	5.40	7.7620	2.7860
Sulfato de Amônia	30	6.38	6.2108	2.4921
	60	6.22	6.6321	2.5753
	90	6.13	7.7465	2.7833
	120	5.86	7.5927	2.7555
	150	5.10	7.3424	2.7097
<i>Trametes sp</i>	30	6.28	7.9397	2.8177
	60	5.36	7.5935	2.7556
	90	4.75	5.7773	2.4036
	120	5.16	9.2191	3.0363
	150	4.54	8.0677	2.8404
Sulfato de Amônia	30	6.24	7.2399	2.6907
	60	5.89	7.9115	2.8127
	90	5.32	5.2343	2.2879
	120	5.78	8.2993	2.8808
	150	4.84	6.2521	2.5004

No caso específico do sulfato de amônia, a menor média da progressão da fronteira micelial do *P. sanguineus* aconteceu para a concentração de 150 mEq./L. A diferença da média entre a menor e maior concentração (30 mEq./L e 150 mEq./L) nesta fonte de nitrogênio foi de 20,6%, sendo que a concentração de 30 mEq./L é onde ocorreu o maior valor para progressão micelial. Para o nitrato de sódio, nota-se que, o menor valor médio para progressão da fronteira micelial em *P. sanguineus* ocorreu para a concentração de 90 mEq./L, e o maior para a concentração de 150 mEq./L. Como a diferença entre as médias encontradas nas concentrações das duas fontes de nitrogênio ultrapassou os 15%, realizamos o teste de análise de variância para determinar se existe diferença estatística entre as médias dos valores encontrados (Tabelas 06 e 07). Os dados mostraram que as duas fontes de nitrogênio nas concentrações testadas não influenciaram no crescimento micelial de *P. sanguineus*.

Tabela 06. Análise de Variância do efeito da concentração de sulfato de amônia no crescimento micelial do *Pycnoporus sanguineus*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
--------------------	-------------------------	----	----	---	---



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Entre Tratamentos	4	10,2389	2,5597	0,36027	0,8355*
Dentro de Tratamentos	45	319,72086	7,1049		
TOTAL	49	329,95976			

* não significativo ao nível $\alpha=0,005$

Tabela 07. Análise de Variância do efeito da concentração de nitrato de sódio no crescimento micelial do *Pycnoporus sanguineus*.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	4	2,4755	0,61882	0,07279	0,99004*
Dentro de Tratamentos	45	399,5877	8,50186		
TOTAL	49	402,0632			

* não significativo ao nível $\alpha=0,005$

Culturas de *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes sp* em meio ágar-malte dextrose acrescidas de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio podem ser observadas nas figuras 04 e 05.

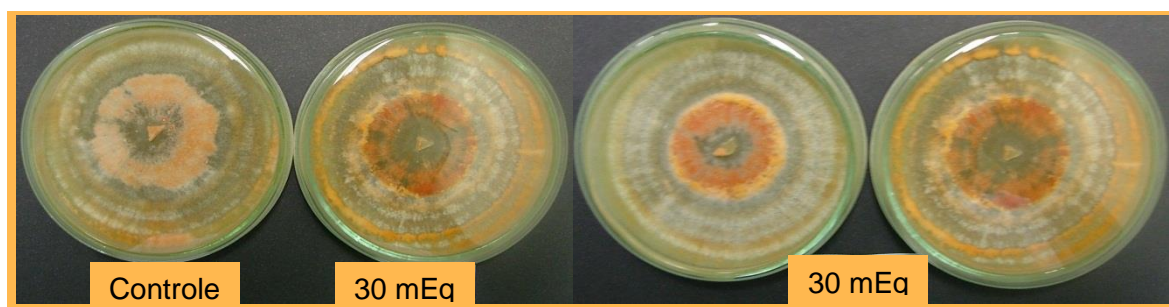


Figura 04. *P. sanguineus* em meio Ágar-malte dextrose acrescido de NaNO_3 .

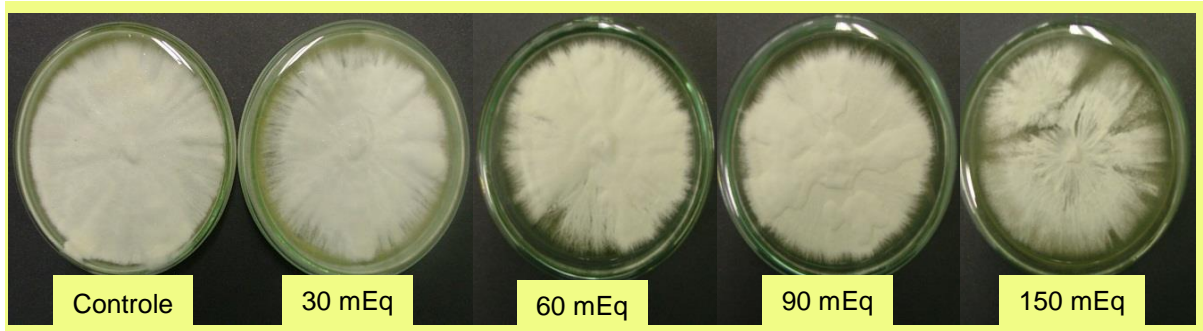


Figura 05. *Trametes* sp em meio Ágar-malte dextrose acrescido de NaNO_3 .

A progressão da fronteira micelial do *Trametes* sp em diferentes concentrações de nitrogênio também mostrou similaridade nos valores absolutos (Tabela 05). Por outro lado, o maior valor médio de crescimento micelial aconteceu na concentração de 30 mEq./L do nitrato de sódio. Diferentemente do que aconteceu com o *P. sanguineus* nota-se que a diferença no valor médio da progressão da fronteira micelial de *Trametes* sp entre a menor e maior concentração foi de 27,71% para o nitrato de sódio e 22,4% para o sulfato de amônia.

Com o intuito também de verificar a existência ou não de diferenças significativas na progressão da fronteira micelial entre as concentrações nas duas fontes de nitrogênio, ou seja, testar a hipótese de que as médias das populações de onde essas amostras provieram são iguais, foi aplicado o teste de análise de variância. Análise de variância mostrou que as médias entre as concentrações dentro de cada fonte de nitrogênio, não são significativas (Tabelas 08 e 09). Portanto, para o fungo *Trametes* sp as duas fontes de nitrogênio nas concentrações testadas não exercem nenhuma influência no sentido de aumentar ou diminuir a produção micelial.

Tabela 08. Análise de Variância do efeito da concentração de sulfato de amônia no crescimento do fungo *Trametes* sp

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	4	12,5159	3,1289		
Dentro de Tratamentos	48	334,21986	6,9629	0,449378	0,7723*
TOTAL	52	346,7357			

* não significativo ao nível $\alpha=0,05$



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Tabela 09. Análise de Variância do efeito da concentração de nitrato de sódio no crescimento do fungo *Trametes* sp

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	4	19,0442	4,76104	0,617118	0,65239*
Dentro de Tratamentos	49	378,0338	7,71497		
TOTAL	53	397,0780			

* não significativo ao nível $\alpha=0,05$

A tabela 10 mostra a velocidade de crescimento expressa em mm/h em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. Observa-se que o maior valor absoluto médio para a velocidade de crescimento ocorreu na concentração de 30 mEq/L para ambos os fungos.

Tabela 10. Crescimento dos fungos (mm/h) em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio.

Fungo	Fonte Nitrogênio	Concentração (mEq.)	Velocidade de crescimento (mm/h)			Var.	DP
			Média	Max.	Min.		
PIC	NS	30	3,9	4,6	3,3	0,0000	0,0037
		60	3,7	4,1	3,3	0,0000	0,0023
		90	3,3	3,5	2,9	0,0000	0,0018
		120	3,5	4,0	2,5	0,0000	0,0048
		150	3,0	3,7	2,6	0,0001	0,0105
		Testemunha	4,5	5,1	3,4	0,0000	0,0136
	AS	30	3,8	4,6	3,2	0,0001	0,0139
		60	3,6	4,1	3,1	0,0001	0,0130
		90	3,5	3,5	2,9	0,0001	0,0123
		120	3,3	4,0	2,7	0,0001	0,0117
150		3,3	3,7	2,8	0,0001	0,0102	
	Testemunha	3,3	4,1	1,3	0,0001	0,0137	
FSF	NS	30	3,6	4,6	3,5	0,0001	0,0127
		60	2,8	3,3	2,0	0,0000	0,0096
		90	2,4	3,0	1,8	0,0000	0,0086
		120	2,5	3,4	1,4	0,0001	0,0101
		150	2,2	3,1	1,3	0,0001	0,0136
		Testemunha	3,8	5,1	3,6	0,0001	0,0137



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

	30	3,6	4,3	3,1	0,0001	0,0128
	60	3,3	4,0	2,6	0,0001	0,0118
AS	90	2,9	3,7	2,2	0,0001	0,0102
	120	3,3	4,0	2,7	0,0001	0,0117
	150	2,5	3,1	2,1	0,0000	0,0086
	Testemunha	3,1	4,1		0,0001	0,0113

Com o objetivo de verificar a influência do nitrato de sódio e sulfato de amônia na velocidade de crescimento dos fungos analisados, foi realizada a análise de variância entre as médias das velocidades encontradas para as diferentes concentrações de nitrogênio.

A tabela 11 mostra os dados da análise de variância para o fungo *Trametes* sp tendo o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Verifica-se diferença significativa entre as médias analisadas ao nível de 5% de significância. Dessa forma seria necessário saber quais concentrações apresentam diferenças significativas entre si. Neste sentido, aplicou-se o teste de Tukey para verificar qualquer contraste entre duas médias de tratamentos.

Tabela 11. Análise de variância dos valores da velocidade de crescimento do *Trametes* sp em meio ágar-malte tendo como fonte de nitrogênio nitrato de sódio.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	5	0,002409	0,000482	4,176	0,00239 *
Dentro de Tratamentos	64	0,007383	0,000115		
TOTAL	69	0,009792			

* significativo ao nível $\alpha = 0,05$

O teste do contraste de duas médias (Tabela 12) mostra que nas concentrações de 30 mEq/L., 60 mEq/L. e 120 mEq/L. o nitrato de sódio não contribui para aumentar a velocidade de crescimento do fungo *Trametes* sp, quando comparadas com a média de crescimento do controle (testemunha). Por outro lado, nas concentrações de 90 mEq/L. e 150 mEq/L. o nitrato de sódio atua de uma maneira inibitória diminuindo velocidade de crescimento quando comparado com o controle (testemunha).



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Tabela 11. Teste de Tukey para contraste de duas médias da velocidade de crescimento do fungo *Trametes* sp em diferentes concentrações de nitrato de sódio.

	30 mEq. M=3,6 {1}	60 mEq. M=2,8 {2}	90 mEq. M=2,4 {3}	120 mEq. M=2,5 {4}	150 mEq. M= 2,2 {5}	Controle M=3,8 {6}
G_1:1 {1}		0.430892	0.120828	0.184193	0.030933^(*)	0.998489496
G_2:2 {2}	0.430892		0.979626	0.99575	0.793625	0.214196766
G_3:3 {3}	0.120828	0.979626		0.999952	0.992791	0.044228842^(*)
G_4:4 {4}	0.184193	0.99575	0.999952		0.971035	0.073045854
G_5:5 {5}	0.030933^(*)	0.793625	0.992791	0.971035		0.009439789^(*)
G_6:6 {6}	0.998489	0.214197	0.044229^(*)	0.073046	0.00944^(*)	

* significativo ao nível de 95%.

A análise de variância para o *Pycnoporus sanguineus* crescendo em meios com diferentes concentrações de nitrato de sódio mostrou significância dentro dos tratamentos usados (Tabela 12).

Tabela 12. Análise de variância dos valores da velocidade de crescimento do *P. sanguineus* em meio ágar-malte tendo como fonte de nitrogênio nitrato de sódio.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	P
Entre Tratamentos	5	0,001398	0,00028	8,6019	3,828 x10⁻⁶ (*)
Dentro de Tratamentos	58	0,001885	3,249 x10 ⁻⁵		
TOTAL	63	0,003283			

*significativo ao nível $\alpha= 0,05$

O Teste de Tukey para verificar o contraste entre duas médias mostra que na concentração de 30 mEq/L. a velocidade de crescimento (mm/h) é significativamente diferente somente em relação a concentração de 150 mEq/L (Tabela 13). No caso específico do *Pycnoporus sanguineus* a velocidade de crescimento no meio sem acréscimo de nitrogênio (controle) é maior e estatisticamente diferente das concentrações de 60, 90, 120 e 150 mEq/L. Portanto, o nitrato de sódio não influencia no aumento da velocidade de crescimento do *P. sanguineus* crescendo em meio ágar-malte.



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Tabela 13. Teste de Tukey para contraste de duas médias da velocidade de crescimento do fungo *P. sanguineus* em diferentes concentrações de Nitrato de Sódio

	30 mEq. M=3,9 {1}	60 mEq. M=3,7 {2}	90 mEq. M=3,3	120 mEq. M=3,5	150 mEq. M=3,0	Controle M= 4,5
G_1:1 {1}		0.890457	0.125762	0.536707	0.00434 ^(*)	0.300033756
G_2:2 {2}	0.890457		0.654082	0.987087	0.069403	0.024198177 ^(*)
G_3:3 {3}	0.125762	0.654082		0.951296	0.786036	0.000347738 ^(*)
G_4:4 {4}	0.536707	0.987087	0.951296		0.267621	0.003899061 ^(*)
G_5:5 {5}	0.00434 ^(*)	0.069403	0.786036	0.267621		0.000136764 ^(*)
G_6:6 {6}	0.300034	0.024198 ^(*)	0.000348 ^(*)	0.003899 ^(*)	0.000137 ^(*)	

* significativo ao nível $\alpha = 0,05$

A Análise de variância para velocidade de crescimento em meio contendo sulfato de amônia mostrou que para ambos os fungos não existe diferença significativa entre as médias das concentrações estudadas (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14. Análise de variância dos valores da velocidade de crescimento do *Trametes* sp em meio ágar-malte tendo como fonte de nitrogênio sulfato de amônia.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
Entre Tratamentos	5	0,000543	0,000109	0,791	0,55936 ^(*)
Dentro de Tratamentos	65	0,008913	0,000137		
TOTAL	70	0,009456			

* não significativo ao nível $\alpha = 0,05$

Tabela 15. Análise de variância dos valores da velocidade de crescimento do *P. sanguineus* em meio ágar-malte tendo como fonte de nitrogênio sulfato de amônia.

Causas de variação	Grau de liberdade (G.L)	SQ	QM	F	p
--------------------	-------------------------	----	----	---	---



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Entre Tratamentos	5	0,000654	0,000131	0,826	0,53556^(*)
Dentro de Tratamentos	60	0,009494	0,000158		
TOTAL	65	0,009456			

* não significativo ao nível $\alpha=0,05$

Nas figuras 08 e 09 podem ser observadas culturas de *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp em meio ágar-malte dextrose acrescido de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio.

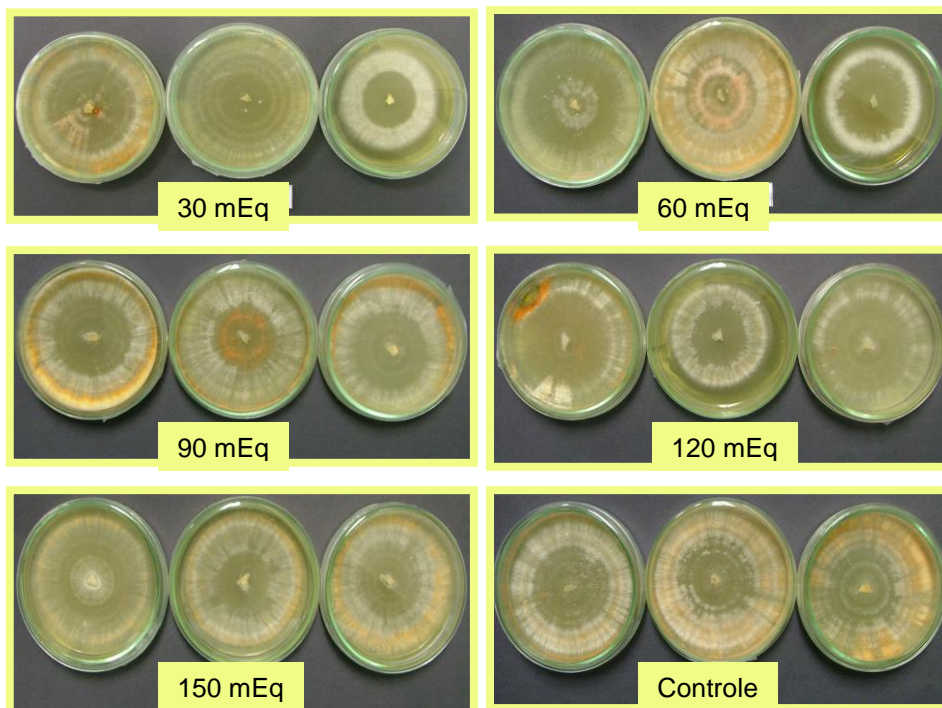




Figura 08. Cultura do fungo *P. sanguineus* em meio Ágar-malte dextrose acrescido de $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

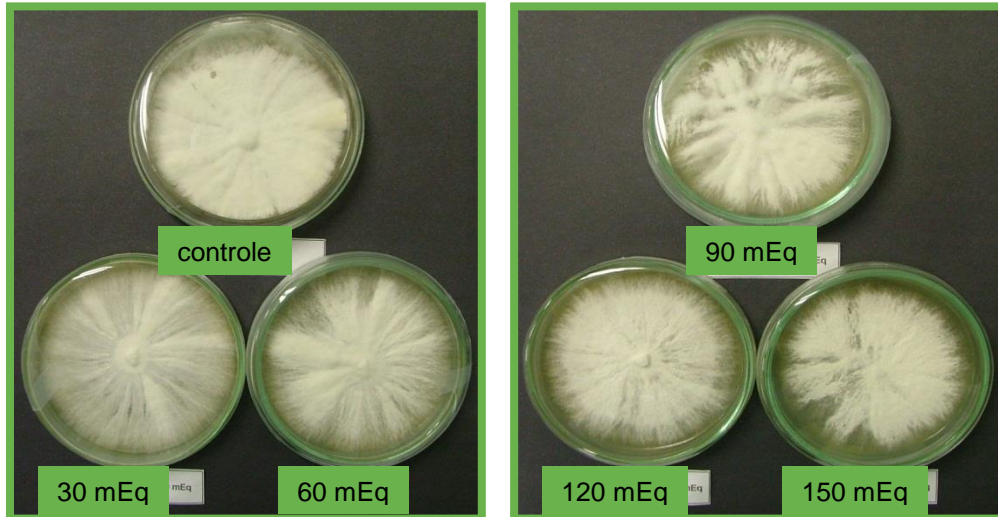


Figura 09. Cultura do fungo *Trametes* sp em meio Ágar-malte dextrose acrescido de $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

Discussão

O método de mensuração linear para avaliar o crescimento dos fungos pode ser considerado viável, simples, econômico, prático além de que permite observar as mudanças na colônia do fungo no meio cultivo por um certo período de tempo. A mensuração do raio da colônia permite avaliar o crescimento micelial, o qual ocorre pela extensão da ponta da hifa, enquanto que as partes mais antigas das hifas são incapazes de crescimento. Embora a hifa mais antiga não seja capaz de crescer, tem um importante papel de suportar o crescimento da ponta à medida que novo protoplasma é formado através da hifa e transportado para a ponta pela corrente citoplasmática ativa (MOORE-LANDECKER, 1982). É este transporte ativo dos componentes sintetizados que faz possível a rápida taxa de crescimento da ponta da hifa, o qual para *Pycnoporus sanguineus* em cultura é em torno de 0,7 a 0,8 mm e *Trametes* sp entre 0,5 a 0,6 mm crescendo em meio Ágar-malte a temperatura de 31°C. Ferraz (1991) observou que a velocidade de crescimento apresenta certa variabilidade numa mesma condição de cultivo daí a necessidade de se conduzir um experimento em condições padronizadas.



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Os fungos amazônicos mostram um padrão de crescimento crescente à medida que aumenta a temperatura o que confirma a tendência já amplamente documentada na literatura científica da extrema importância desse parâmetro na determinação da quantidade e taxa de crescimento de um organismo. O aumento da temperatura em geral aumenta a atividade enzimática (MOORE-LANDECKER, 1982), uma vez que o movimento das moléculas da enzima e do substrato aumentam, provocando colisões entre enzima e substrato resultando na formação de mais produto.

Outro requisito físico que afeta o crescimento do fungo é o pH, pois pode influenciar a disponibilidade de certos íons metálicos. Estes podem formar complexos que se tornam insolúveis em certas faixas de pH. No caso dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp a relação positiva de crescimento micelial com o aumento do pH, de uma certa forma mostra que o crescimento no pH 4 (baixo) pode estar diretamente relacionado ao resultado direto da grande disponibilidade de ferro, enquanto no pH alto (5 -7) pode ser devido o aumento da atividade enzimática com o pH ótimo alto.

Na faixa de pH 5 -7 ocorreu o melhor crescimento de ambos os fungos, sendo que na faixa de 5-6 verificou-se o máximo crescimento. Este resultado mostra que o pH apresenta influência no crescimento fúngico, portanto torna-se necessário o controle do pH. Castro e Silva (1996) também observou similar efeito do pH para os fungos *Antrodia albida* e *Tyromyces* sp, os quais preferiram pH pouco ácido com uma faixa de pH 5-8 e o ótimo em pH 6.

Os resultados do estudo da fonte de nitrogênio mais adequada ao crescimento de *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp indicaram que ambos os fungos utilizam indiscriminadamente NO_3^- ou NH_4^+ como fonte de nitrogênio. A utilização de NO_3^- ou NH_4^+ como fonte de nitrogênio proporciona a vantagem de se empregar qualquer dos dois íons (FERRAZ, 1991), enquanto que vários fungos necessitam de uma forma específica de nitrogênio, uréia ou aminoácidos (MOORE-LANDECKER, 1982). Ressalta-se, entretanto, que a velocidade de crescimento máxima dos fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp ocorreu na concentração de 30 mEq /L de nitrogênio.

O nitrogênio presente na madeira e seu papel na deterioração da mesma tem sido estudado há muito tempo sendo comprovado que fungos xilófagos degradam a madeira a despeito do seu baixo teor de nitrogênio, sugerindo-se que autólise e re-uso do nitrogênio é um mecanismo pelo qual o fungo pode conservar a pouca fonte de nitrogênio na madeira (ERIKSSON et al., 1980).



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

Estudos têm mostrado que a degradação é aumentada se o nitrogênio é adicionado, mas uma alta concentração parece ser inibitória. Keyser et al. (1978) apud Eriksson et al. (1980), por outro lado, mostraram que a degradação da lignina parece acontecer somente nas condições de falta de nitrogênio. Os dados obtidos para o nitrogênio, neste estudo indicam ou sugerem que os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp, apresentam bom crescimento micelial em todas as concentrações de nitrogênio testadas. Ressalta-se, entretanto, que esse resultado diz respeito ao avanço da fronteira micelial, e não à degradação da celulose ou da lignina encontrada na madeira. Pelo menos para os fungos testados, o nitrogênio não é um fator limitante para a produção micelial. Recomendam-se estudos complementares da mistura de várias fontes de nitrogênio para se determinar se as mesmas proporcionam um melhor crescimento do que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou NaNO_3 sozinhos. Eriksson et al. (1980), mostraram que a mistura de uréia e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ proporcionou melhor crescimento para fungos testados, uma vez que com uréia o nível de pH é mantido mais constante e próximo do pH ótimo para crescimento dos fungos. Esses autores mostram que com $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sozinho ocorre uma queda no nível de pH devido à amônia. Entretanto para os fungos *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes* sp testados neste estudo, a amônia não é fator limitante para produção micelial, uma vez que eles mostraram bom crescimento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em todas as concentrações testadas.

Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos, conclui-se que os fungos *P. sanguineus* e *Trametes* sp testados a diferentes temperaturas, apresentaram um ótimo térmico na faixa de 30 - 35°C, mas com produção micelial a partir de 25°C. Quanto à exigência de nitrogênio para crescimento micelial os fungos *P. sanguineus* e *Trametes* sp mostraram-se tolerantes nas concentrações usadas (30mEq/L, 60mEq/L, 90mEq/L, 120mEq/L e 150mEq/L). A faixa de pH ótima para ambos os fungos é de 5 a 7.

Referências bibliográficas

AZEVEDO, J. L. Fungos: Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp>> Acesso em 05/02/2005.



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

- BONONI, V.L.R. Biodegradação de Organoclorados no solo por Basidiomicetos Lignocelulosíticos. In: **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA- CNPMA (243-268). 1997.
- CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da Degradação de Madeira da espécie Amazônica *Hura creptans* L. por fungos ligninolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes** (Tese de Doutorado). Manaus: INPA/FUA. 1996.
- ERIKSSON, K.; ERUNEWALD, A.; VALLANDER, L. Studies of growth conditions in wood for tree white-rot Fungi and their cellulases less mutants. **Biotech. Bioeng.** 22 : 363-376. 1980.
- ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.
- FERRAZ, A.L. **Contribuição ao Estudo do Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*: Biodegradação de madeira e seus componentes**. Tese de Doutorado. UNICAMPI. SP. 131pp. 1991.
- HAMLYN, P.F. Fungal biotechnology. **British Mycol. Soc. Newsletter** 3: 45-56. 1998.
- HATAKKA, A. Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. **FEMS Microbiological Reviews** 13, 125-135. 1994
- HIGUCHI, T. Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation Wood. **Science Technology** 24: 23-63. 1990.
- KEYSER, P.; KIRK, T. K.; ZEIKUS, J.G.J. **Bacteriol.** 135 : 790-810.1978.
- LACAZ, C.L. et al.; **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: ARVIER. 2002
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the FUNGI**. New Jersey: Prentice-Hall, INC. Englewood Cliffs.578pp. 1982
- MORAIS, A. M.L. et al.; FUNGOS: Ferramentas na saúde pública As utilidades de um antigo vilão. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2003. Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio07/7_b.asp> Acesso em 05/02/2005.
- NEUFELD, P. **Micologia**. Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro - RJ. 1997.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos Dos Fungos**. Vol. 1. 2ed . Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.



MARUPIARA

REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE PARINTINS

SOARES, C. H. L. **Estudos Mecanísticos da Degradação de Efluentes de Indústrias de Papel e Celulose por Fungos Basidiomicetos Degradadores de Madeira.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – SP, 1998.

Trabalho apresentado em 18/12/2015

Aprovado em 12/02/2016