

**ISOLAMENTO, RASTREIO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DE  
FUNGOS CELULOLÍTICOS ISOLADOS DO MEIO AMBIENTE**

Nelson Lima

Ciência Integrada, Universidade do Minho,  
4719 Braga Codex, Portugal

**SUMMARY**

In the present paper 38 different strains of filamentous fungi isolated from soils or from plant and cellulosic wastes of various regions of Portugal were studied for their cellulolytic ability. These isolates together with *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger* fungi (as positive controls) were screened for their cellulolytic ability by the rapid and qualitative method of cellulose-azure. Further determination of their relative and quantitative cellulolytic activities was performed by the depth of clearing screening test. This test was also used to study the effect of Walseth cellulose concentration on depth of clearing.

**SUMÁRIO**

Neste trabalho, estudamos as capacidades celulolíticas de 38 diferentes fungos filamentosos isolados a partir do solo ou de resíduos vegetais e celulósicos provenientes de várias regiões de Portugal. Estes isolamentos conjuntamente com os fungos *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger* (utilizados como controlos positivos) foram testados na sua capacidade celulolítica através do método rápido e qualitativo da celulose-azure. Para posterior determinação das actividades celulolíticas relativas e quantitativas destes isolamentos utilizámos o teste da medição da profundidade de clareamento do meio opaco de celulose Walseth. Este teste foi também usado para o estudo do efeito da concentração do substrato na medição da profundidade de clareamento.

**INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos verificamos um forte e amplo interesse pela procura e utilização de novas fontes de biomassa renovável devido a uma maior consciencialização dos grandes problemas à escala planetária: como a fome, as reservas

limitadas de combustíveis fósseis, a maior necessidade de produtos químicos para a indústria e a ruptura de equilíbrios ambientais (1). Neste cenário, por um lado, a celulose é a única fonte de carbono renovável na Natureza disponível em grandes quantidades que pode ser usada para resolver os problemas de produção de energia (2), de produtos químicos como o etanol, ácidos orgânicos e outros (2) ou de alimentos (2,3); por outro lado, as lixeiras de origem urbana e agro-industrial são também uma fonte disponível de material celulósico. Nos lixos domésticos do Continente Português o papel e o cartão representam cerca de 400000 toneladas/ano (aproximadamente 20% do lixo total) (4). Nos resíduos agro-industriais salientam-se em Portugal o bagaço de uva e o repiso de tomate com uma produção média anual de 5000 toneladas de peso seco para cada caso (5).

A conversão da celulose para açúcares solúveis é feita essencialmente por microrganismos através do seu complexo hidrolítico celulásico. Os fungos são os microrganismos com maior capacidade de degradarem enzimaticamente a celulose existente em habitats terrestres ao passo que as bactérias são provavelmente os maiores agentes da degradação da celulose em habitats marinhos. Nos últimos anos, os fungos têm sido sujeitos a um estudo intenso no sentido de se obter um maior conhecimento das suas características celulolíticas (1). Assim, o estudo da hidrólise enzimática microbiana da celulose tem tido um grande desenvolvimento pelas suas implicações tecnológicas e económicas bem como, a procura de novas fontes de celulasas tem sido uma preocupação constante nos últimos anos. Os trabalhos de rastreio de fungos celulolíticos oriundos de diferentes habitats tornam-se assim de grande oportunidade não só pelas informações fornecidas no domínio da ecologia e da microbiologia ambiental, mas também pela possibilidade de um emprego de estirpes celulolíticas na área das biotecnologias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e manutenção de fungos

Para o isolamento de fungos celulolíticos foi usado o meio de Bose (MB)(6). O substrato, papel de filtro Whatman nº1, foi tratado com HCl numa concentração de 3% (p/v) durante 3h à temperatura de 25°C, com agitação ocasional. Esta suspensão foi diluída em 5 l de água destilada com forte agitação simultânea e deixada a repousar durante 2h. Eliminou-se o sobrenadante. Todo o sedimento foi colocado num funil de Buchner com três filtros de pano de linho e lavado com água destilada até à neutralização. Em seguida lavou-se a celulose com etanol a 95% e deixou-se secar ao ar. Finalmente, este meio foi preparado adicionando o meio de base de Czapek com a composição por litro de água destilada de 3g de  $\text{NaNO}_3$ , 1g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g de KCl e 0,01g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ao substrato previamente tratado na concentração de 1% (p/v) e ao agar na concentração de 1,5% (p/v). Num almofariz e com a ajuda de um pilão formou-se uma pasta fina e uniforme a que se ajustou o pH a 5,4 com a adição de ácido láctico. Aliquotas de 20ml de meio foram distribuídas em tubos de 2,5x15cm e estes sujeitos à esterilização por autoclavagem a 121°C durante 15 min. Deixou-se arrefecer o meio até aos 45°C e depois de uniformizar este por agitação no vortex colocou-se em caixas de Petri. Os tubos com meio MB que não foram imediatamente usados foram guardados no frigorífico a 4°C.

Pequenas fracções de material proveniente das nossas colheitas foram colocadas em placas de MB que eram seguidamente incubadas a 25°C durante quatro a sete dias. Os fungos celulolíticos que se desenvolveram foram reconhecidos pela presença de zonas de clareamento do meio, à volta das respectivas colónias. Estes fungos, foram repicados para novas placas com meio MB e incubadas a 25°C durante sete dias. Os fungos foram transferidos para placas de agar de batata dextrosada (ABD) suplementado com estreptomina na concentração de 0,01% (p/v) para eliminação de bactérias contaminantes. As placas foram incubadas a 25°C durante quatro a sete dias.

Finalmente, depois de estar assegurada a pureza dos isolamentos, estes foram repicados para tubos com ABD inclinado e para placas com ABD. Incubaram-se a 25°C durante quatro a sete dias. Os tubos e as placas foram seladas e guardadas no frigorífico a 4°C durante um mês. Procedeu-se mensalmente à renovação das culturas.

### Organismos

Para os isolamentos da nossa colecção de fungos, foi criado um código de catalogação, com a seguinte simbologia:

UA.p.q.

em que, UA são as iniciais da Universidade de Aveiro; p, representa o número de ordem, local e data de colheita; q, representa o número do isolamento da série pertencente a UA.p. (Tabela I).

Os Fungos *Trichoderma viride* Persoon ex Fries (LNETI) e *Aspergillus niger* van Tieghen (ATCC-6275) (TUB) (FCL) foram usados como estirpes de controlo positivo para os vários ensaios.

### Método da celulose-azure para rastreio qualitativo

Foi preparado o meio de Pettersson modificado (MPM) (7) com a composição por litro de água destilada de 2g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,

**TABELA I**  
**ORIGEM DOS FUNGOS ISOLADOS NESTE TRABALHO.**

Série	Natureza da Amostra	Local de Colheita	Data de Colheita
UA.1.	Material Vegetal em Decomposição	Vale de Canas, Coimbra	Novembro de 1986
UA.2.	Madeira com podridão	Aveiro	Março de 1987
UA.3.	Lamas Celulósicas	Portucel-Cacia, Aveiro	Março de 1987
UA.4.	Folhas de Acácia em Decomposição	Afife, Viana do Castelo	Março de 1987
UA.5.	Tronco Morto de Plátano	Maiorca, Figueira da Foz	Abril de 1987
UA.6.	Meio Contaminado	Laboratório-UA, Aveiro	Abril de 1987

0,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 55mg de  $\text{CaCl}_2$ , 10mg de  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 4,4mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $100\mu\text{g}$  de Tiamina-HCl (Merck), 1g de Extracto de Levedura (Difco), 7,5g de Agar (Difco). Depois, 2,0ml de MPM foram colocados em tubos de ensaio de 1,6x7,5cm e autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min. O meio foi deixado solidificar com os tubos na posição vertical. Preparou-se um segundo lote de MPM usando, da água destilada necessária, apenas 2/3 do volume (fracção A). Ao 1/3 do volume de água destilada restante misturou-se celulose-azure (Sigma, Tipo II, C8647) (fracção B). A concentração final de celulose-azure foi de 2% (p/v). Autoclavaram-se as fracções A e B separadamente a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min. As duas fracções foram misturadas ainda quentes e transferiu-se 0,5ml para cima do meio base solidificado existente em cada tubo (8).

Os tubos assim preparados apresentavam uma camada inferior de MPM e uma camada superior de MPM suplementado de celulose-azure que lhe conferia a cor azul. Estes tubos foram inoculados com os nossos isolamentos e colocados a incubar a  $25^\circ\text{C}$  para pesquisa de fungos celulolíticos. As leituras foram efectuadas ao 2º, 5º e 10º dia e foi feito o respectivo registo da intensidade de cor azul difundida da camada superior para a camada inferior.

### Método da medição da profundidade de clareamento do meio opaco para rastreio quantitativo

O meio opaco (MO) (9,10) foi preparado com a composição por litro de água destilada de 2g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,89g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 $\mu\text{g}$  de Tiamina-HCl (Merck), 0,5g de Extracto de Levedura (Difco), 4mg de Adenina (Sigma), 8mg de Adenosina (Sigma) e 17g de Agar (Difco). Como substrato foi usado a celulose Walseth. Esta foi preparada a partir de 30,0g de celulose Whatman CF11 suspensa em 400ml de ácido Orto-fosfórico a 85%. Depois de a suspensão ter sido agitada vigorosamente durante 2h foi adicionado a esta 2l de água destilada. Esta suspensão foi filtrada através de cinco filtros de pano de linho sobre dois filtros Whatman nº1. A celulose foi, em seguida, dispersa em 5l de água bidestilada. Repetiu-se a filtração. Redispersou-se a celulose em 1l de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2% (p/v) com a ajuda de um misturador eléctrico. Deixou-se repousar durante 12h. Ao fim deste tempo, o homogeneizado foi lavado com 5l de água destilada. Foi filtrado de novo. Suspendeu-se o filtrado em 1,5l de água destilada. Esta suspensão foi centrifugada a 10000 rpm durante 5 min numa centrífuga Heraeus-Christ, modelo Cryofuge 20-3 e o sedimento obtido foi homogeneizado durante 5 min com um misturador eléctrico. Verificou-se o pH da suspensão que deveria ser aproximadamente de 6,5. Finalmente, foi determinado o factor de conversão de peso seco para peso húmido.

Depois de a celulose ter sido tratada pelo ácido adicionou-se, para completar o meio MO, nas concentrações de 0,125%, 0,25%, 0,5% e 1% (p/v). O meio foi distribuído por tubos de ensaio de 1,6x16cm contendo cada um 10ml de MO. Os tubos foram autoclavados a 121°C durante 15 min. Feita a esterilização, os tubos foram arrefecidos num banho frio, com agitação constante entre as mãos, para rápida solidificação do meio na posição vertical e para garantir a sua total uniformização.

Os tubos foram inoculados com um disco de 12mm de diâmetro a partir de culturas dos isolamentos em ABD com sete dias de crescimento. Para cada fungo fez-se 3 réplicas que depois foram incubadas a 25°C durante 35 dias. As leituras da profundidade de clareamento foram feitas de sete em sete dias com uma régua de escala milimétrica e determinou-se o valor médio para cada caso em estudo.

## RESULTADOS

### Obtenção da colecção de fungos

Após seis meses de colheitas em diferentes materiais celulósicos e em diversos locais, obtivemos 38 isolamentos com a capacidade de crescerem no meio selectivo de MB e provocarem uma auréola de clareamento do meio (opaco devido à celulose) à volta das respectivas colónias.

### Estudo qualitativo da actividade celulolítica dos isolamentos

Ao estudarmos a capacidade dos nossos isolamentos serem celulolíticos com o teste da celulose-azul (Tabela II) observámos que 11 dos fungos isolados, nomeadamente UA.1.2, UA.1.4, UA.1.7, UA.1.9, UA.1.10, UA.1.11, UA.1.12, UA.4.2, UA.5.2, UA.5.3 e UA.5.4, apresentavam máxima libertação de cor azul (++++) ao fim dos 10 dias de teste, tal como o fungo *Aspergillus niger* que serviu de controlo positivo (Fig.1). Oito dos fungos isolados apresentavam grande libertação de cor azul (+++) comparável a *Trichoderma viride* (controlo positivo) e, 13 isolamentos apresentavam menor libertação de cor azul (++ e +) do que os fungos precedentes. Os restantes seis fungos isolados apresentavam resultados negativos (0) idênticos ao tubo não inoculado que serviu de branco (controlo na Fig.1).

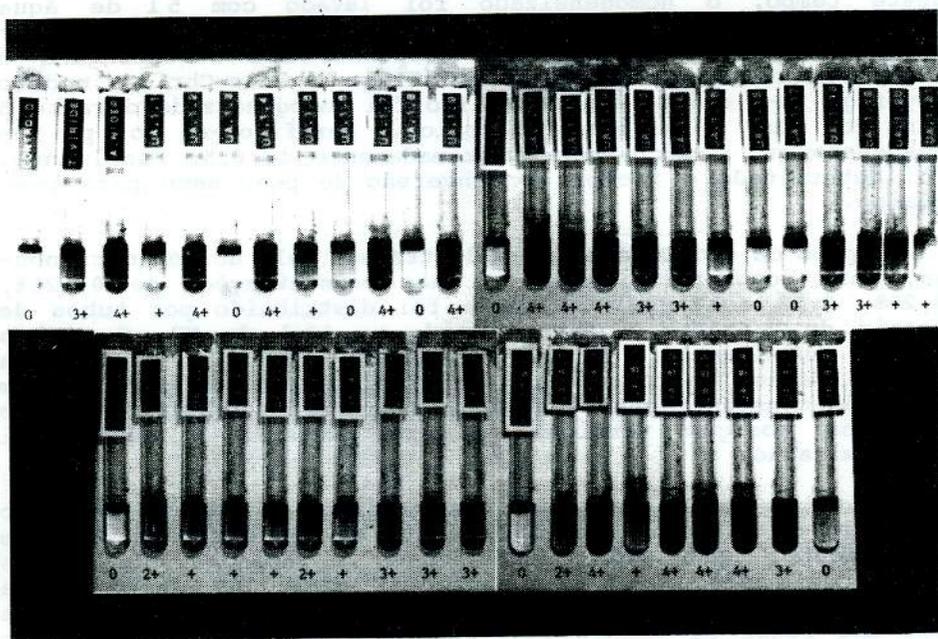


FIGURA 1. Aspecto dos tubos do teste da celulose-azul para os fungos isolados ao fim de 10 dias de incubação a 25°C. **CONTROLO** - tubo não inoculado; 0 - ausência de libertação de cor azul; + a 4+ - aumento relativo de libertação de cor azul.

### Estudo quantitativo da actividade celulolítica dos isolamentos

Os resultados que acabámos de expôr permitem-nos dizer que dentro da nossa colecção tínhamos 50% de fungos com boa actividade celulolítica. Estudámos, por isso e em seguida, o

TABELA II

REGISTO DA INTENSIDADE DA COR AZUL DIFUNDIDA NA CAMADA INFERIOR DOS TUBOS NO TESTE DA CELULOSE-AZURE PARA OS FUNGOS ISOLADOS.

TEMPO FUNGO	2º Dia	5º Dia	10º Dia
CONTROLO	0	0	0
<i>T. viride</i>	0	++	+++
<i>A. niger</i>	++	+++	++++
UA. 1.1	0	0	+
UA. 1.2	0	++	++++
UA. 1.3	0	0	0
UA. 1.4	0	++	++++
UA. 1.5	0	0	+
UA. 1.6	0	0	0
UA. 1.7	+	+++	++++
UA. 1.8	0	0	0
UA. 1.9	0	++	++++
UA. 1.10	+	+++	++++
UA. 1.11	0	++	++++
UA. 1.12	+	+++	++++
UA. 1.13	0	++	+++
UA. 1.14	0	++	+++
UA. 1.15	0	0	+
UA. 1.16	0	0	0
UA. 1.17	0	0	0
UA. 1.18	0	++	+++
UA. 1.19	0	++	+++
UA. 1.20	0	0	+
UA. 1.21	0	+	+
UA. 2.1	0	+	++
UA. 2.2	0	+	+
UA. 2.3	0	+	+
UA. 2.4	0	0	+
UA. 2.5	0	+	++
UA. 2.6	0	0	+
UA. 2.7	0	++	+++
UA. 3.1	0	++	+++
UA. 3.2	0	++	+++
UA. 4.1	+	++	++
UA. 4.2	0	+++	++++
UA. 5.1	0	+	+
UA. 5.2	+	+++	++++
UA. 5.3	++	+++	++++
UA. 5.4	+	+++	++++
UA. 6.1	+	++	+++
UA. 6.2	0	0	0

0 - Ausência de libertação da cor azul.

+ + + + + - Aumento relativo de libertação da cor azul

comportamento dos isolamentos em meio opaco (devido à presença da celulose Walseth). Usámos diferentes concentrações de substrato e incubámos os fungos durante 35 dias a 25°C.

Os resultados obtidos estão compilados na Tabela III. Na Fig.2 apresentámos o aspecto dos tubos de alguns isolamentos ao fim deste teste e para a concentração de 0,5%. Na Fig.3A e 3B estão representados os resultados dos fungos isolados

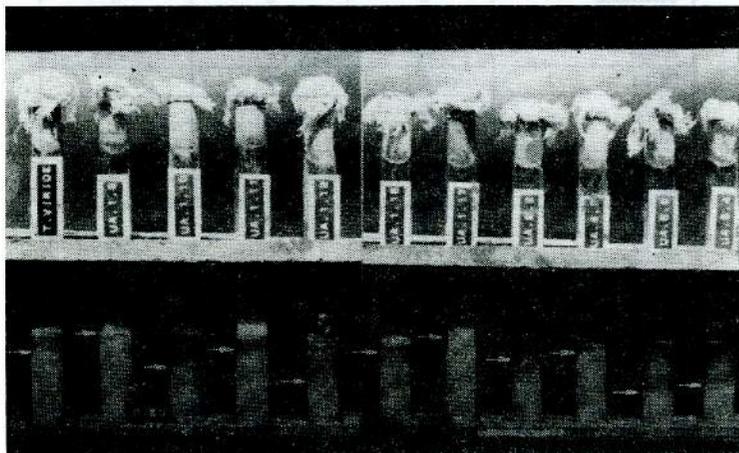


FIGURA 2. Aspecto dos tubos no teste da medição da profundidade de clareamento para alguns isolamentos com a concentração de substrato de 0,5% ao fim de 35 dias de incubação a 25°C. As setas indicam os níveis de clareamento do meio opaco.

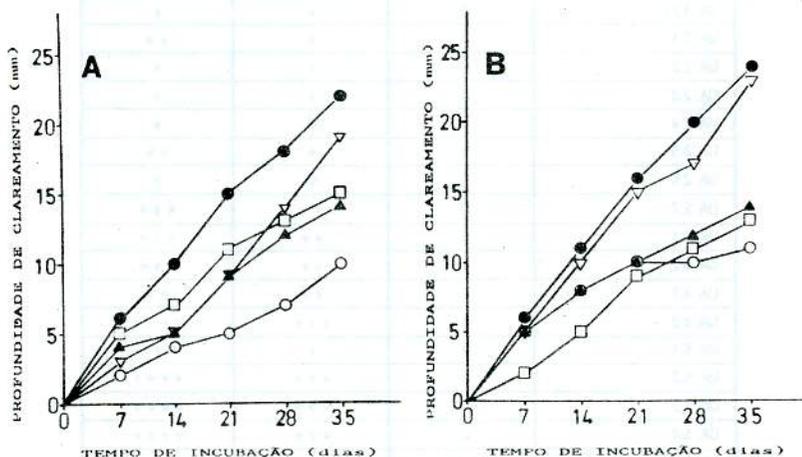


FIGURA 3. Variação da profundidade de clareamento dos fungos UA.1.2 (▲), UA.1.12 (▽), UA.4.2 (□), UA.5.4 (●) e *T. viride* (○) ao longo de 35 dias de incubação a 25°C para a concentração de 0,25% (A) e 0,5% (B) de celulose Walseth.

TABELA III

VALORES DA PROFUNDIDADE DE CLAREAMENTO PARA OS FUNGOS ISOLADOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ENSAIO.

TEMPO (DIAS)		Profundidade de Clareamento (mm)																			
		Celulose Walsath 0,125%					Celulose Walsath 0,25%					Celulose Walsath 0,5%					Celulose Walsath 1,0%				
		7	14	21	28	35	7	14	21	28	35	7	14	21	28	35	7	14	21	28	35
CONTROLO		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>T. viride</i>		2	5	9	11	13	2	4	5	7	10	5	8	10	10	11	3	5	5	6	6
<i>A. niger</i>		2	4	6	7	9	2	3	5	6	8	4	5	7	8	10	3	3	5	5	6
UA. 1.1		0	3	5	7	9	0	2	5	7	8	0	1	3	4	5	0	1	2	3	4
UA. 1.2		6	10	14	17	19	4	5	9	12	14	5	8	10	12	14	3	6	6	7	10
UA. 1.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.4		2	4	6	9	12	3	5	7	11	13	3	5	7	9	13	2	4	5	7	8
UA. 1.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.7		3	6	10	14	20	3	7	11	15	21	2	6	10	13	18	2	5	8	13	18
UA. 1.8		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.9		4	9	11	14	15	4	6	9	11	13	3	5	8	10	11	3	6	8	9	10
UA. 1.10		4	8	11	16	19	4	7	10	12	16	3	6	9	12	16	4	6	9	11	13
UA. 1.11		1	4	6	10	11	2	4	6	9	11	1	3	5	7	8	1	3	5	6	7
UA. 1.12		3	5	10	15	20	3	5	9	14	19	5	10	15	18	23	1	4	8	11	14
UA. 1.13		0	2	5	7	9	0	4	7	9	11	0	2	4	5	7	0	2	4	5	7
UA. 1.14		3	7	9	12	15	4	6	8	11	14	2	4	6	8	11	2	4	6	8	11
UA. 1.15		1	3	6	10	13	1	3	6	8	11	0	1	4	5	7	0	1	3	4	5
UA. 1.16		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.17		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.18		0	0	2	3	3	0	0	2	3	3	0	0	1	2	2	0	0	1	2	2
UA. 1.19		0	3	7	11	13	0	4	8	12	15	0	2	5	8	10	0	2	5	7	9
UA. 1.20		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 1.21		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 2.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 2.2		2	6	10	14	17	2	4	7	10	14	1	3	6	10	13	1	3	5	7	9
UA. 2.3		0	0	1	2	3	0	0	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 2.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 2.5		0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 2.6		0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 2.7		3	5	7	9	11	4	6	8	10	12	2	5	7	10	11	2	4	6	8	9
UA. 3.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 3.2		1	2	4	8	11	2	4	6	9	11	1	2	4	6	8	1	4	5	6	7
UA. 4.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 4.2		4	9	11	13	15	5	7	11	13	15	2	5	9	11	13	1	3	5	5	5
UA. 5.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 5.2		3	7	10	13	17	6	10	14	17	20	5	9	12	16	19	4	8	11	14	18
UA. 5.3		6	11	16	20	25	6	10	14	18	22	6	11	16	19	21	4	8	11	13	16
UA. 5.4		6	10	15	18	21	6	10	15	18	22	6	11	16	20	24	4	9	14	17	21
UA. 6.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UA. 6.2		2	4	12	15	16	3	3	8	11	12	2	4	6	7	8	2	4	7	8	8

UA.1.2, UA.1.12, UA.4.2, UA.5.4 e *Trichoderma viride* (controlo positivo) para as concentrações de substrato 0,25% e 0,5% respectivamente. Verificámos, em ambos os casos, que o fungo isolado UA.5.4 apresentava uma maior capacidade hidrolítica do que os restantes isolamentos.

Comparámos o comportamento destes isolamentos às diferentes concentrações de substrato. Observámos para o isolamento UA.1.2 que a concentração de substrato mais favorável à hidrólise foi a de 0,125% (Fig.4A) e, para os isolamentos UA.1.12 e UA.5.4 foi a concentração de 0,5% (Fig.4B e 4D respectivamente). Por último, o isolamento UA.4.2 apresentava o mesmo comportamento hidrolítico para as concentrações de

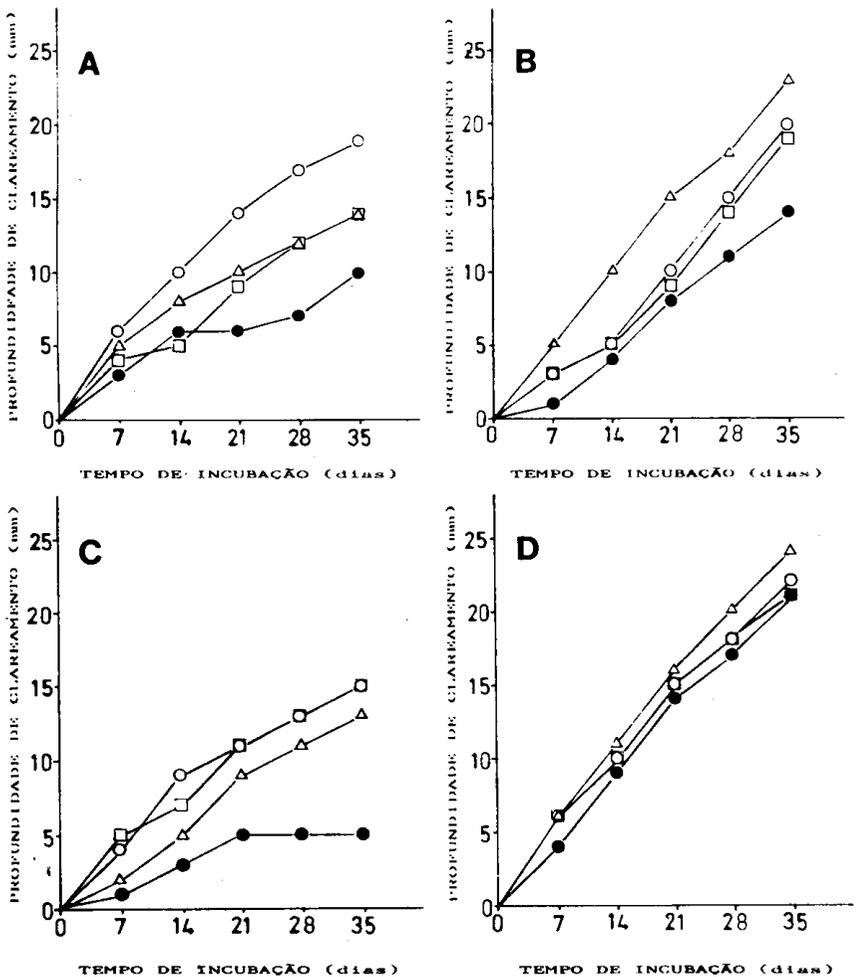


FIGURA 4. Efeito da concentração de 0,125% (○), 0,25% (□), 0,5% (△) e 1% (●) da celulose Walseth na profundidade de clareamento ao longo de 35 dias de incubação a 25°C para o fungo UA.1.2 (A), UA.1.12 (B), UA.4.2 (C) e UA.5.4 (D).

0,125% e 0,25% de substrato (Fig.4C). Estes resultados indicam-nos que as melhores concentrações de substrato para este teste são a de 0,25% e a de 0,5%.

Para a concentração de 0,125%, encontrámos frequentemente dificuldades de definir correctamente o limite entre o meio hidrolisado (transparente) do meio não hidrolisado (tenuamente opaco devido à baixa concentração de celulose Walseth). Para a concentração de 1% de substrato observámos globalmente uma diminuição nos valores da profundidade de clareamento (Tabela III e Fig.4).

### DISCUSSÃO

Para isolarmos fungos celulolíticos foi necessário recorrer a um tipo de meio que fosse selectivo e, se possível, diferencial. O meio MB foi escolhido por apresentar na sua composição química a celulose como única fonte de carbono e energia bem como, o meio tornar-se transparente à volta das colónias produtoras de celulases extracelulares (6). Estava assim, assegurado pelo meio MB a capacidade de ser, respectivamente, selectivo e diferencial.

O uso deste meio, para isolamento dos fungos, demonstrou ser de grande utilidade quer pela simplicidade da sua preparação quer pela facilidade de identificação das colónias capazes de formarem à sua volta auréolas transparentes. Contudo, observámos que o aumento do tempo de incubação permitia o desenvolvimento de colónias de bactérias crescidas à custa dos produtos de hidrólise da celulose. Este facto foi contrariado pela diminuição do tempo de incubação, quatro a sete dias, das placas com os materiais naturais e, pela transferência dos fungos para novas placas de MB até ao seu isolamento livre de bactérias contaminantes. A obtenção das culturas puras foi feita em ABD suplementado com estreptomicina. Este tratamento foi muito eficaz na eliminação das bactérias que persistiam ao longo das sucessivas repicagens. A manutenção das culturas puras dos fungos isolados foi feita em ABD. Foi usado nestes casos o ABD por ser um bom meio de rotina para manutenção de fungos. Nesta primeira fase do nosso trabalho não tivemos a preocupação de quantificar o diâmetro das auréolas de clareamento produzidas à volta das colónias dos nossos isolamentos, pois, a obtenção de uma colecção de fungos potencialmente celulolíticos era, de momento, o nosso objectivo principal.

Após a obtenção de 38 fungos isolados, que passaram a constituir a nossa colecção, estes foram sujeitos ao primeiro rastreio pelo método da celulose-azure. Com a realização deste teste pretendemos não só, ter uma primeira avaliação, mesmo que qualitativa, das capacidades celulolíticas dos nossos isolamentos mas também, avaliar o interesse deste teste para uma detecção rápida de microrganismos celulolíticos. Pelos resultados obtidos para este teste concluímos que os nossos

isolamentos apresentaram boa actividade hidrolítica em relação ao substrato, bem como, o teste mostrou ter um procedimento simples e apresentar resultados rápidos e com boa visualização. Assim, este teste dará uma boa resposta a um rastreio qualitativo envolvendo um grande número de amostras. É de referir ainda, que comparando a celulose-azure com os derivados solúveis da celulose (e.g. carboximetilcelulose) aquela constitui o substrato mais semelhante à celulose nativa (11). Desta forma, torna-se evidente que o uso da celulose-azure poderá ser mais correcto do que substratos solúveis para medir a actividade celulolítica. Por último, admitimos que a quantidade e a velocidade de difusão da tinta azul libertada para a camada basal do tubo estará relacionada com o grau de actividade celulolítica relativa de cada fungo (8). Contudo, ainda não foi possível encontrar um método que permita quantificar esta relação.

Para termos uma informação quantitativa da capacidade celulolítica dos nossos fungos isolados optámos, em seguida, por realizar o teste da medição da profundidade de clareamento do meio opaco. Este método baseia-se no princípio da dissolução da celulose como aspecto essencial da degradação desta por enzimas libertadas e difundidas, por fungos em crescimento, ao longo da coluna opaca (9). A zona de clareamento do meio opaco é o resultado directo da dissolução da celulose e a medida da sua profundidade um resultado indirecto da capacidade celulolítica de cada fungo.

Observámos que os resultados de *Trichoderma viride* (ver Tabela III) apresentaram para 0,5% de substrato as profundidades de 5, 8, 10, 10 e 11mm ao passo que, Tansey (10) encontrou para *Trichoderma viride* QM6a para as mesmas condições de ensaio os valores de 5, 7, 10, 13, 15mm. Rautela e Cowling (9) para os dias 14, 21, 28, e 35 encontraram, para o mesmo fungo, os valores de 7, 10, 13, 16mm, respectivamente. Pelo que acabámos de referir, concluímos que até ao 21º dia obtivemos valores idênticos aos encontrados pelos referidos autores, tendo-se verificado nos dias 28º e 35º uma diminuição nos nossos valores em relação aos citados. Contudo, quer admitamos os valores por nós encontrados quer os valores encontrados por estes autores para *Trichoderma viride*, como valores padrão de boa actividade celulolítica, verificámos que dentro da nossa colecção de isolamentos possuíamos fungos com melhores actividades celulolíticas do que *Trichoderma viride* (ver Tabela III).

Consideramos que o teste da medição da profundidade de clareamento é um método simples para determinar a actividade celulolítica relativa de fungos. Uma das características mais importantes deste método é só necessitar de equipamento simples para a sua realização, tornando-o muito conveniente para rastreio em larga escala. As melhores concentrações de substrato para a realização deste teste foram as de 0,25% e 0,5% como já referimos nos RESULTADOS. A concentração de

0,125% para além das dificuldades por nós encontradas, pode ser uma boa concentração para fungos com baixa actividade celulolítica (9). A concentração de 1% de substrato mostrou-se inadequada para este teste uma vez que, os valores observados foram inferiores aos valores obtidos para as outras concentrações ensaiadas.

#### REFERÊNCIAS

1. LIMA, N. (1989). Degradação enzimática da celulose por fungos. *Bol. Soc. Port. Ciências Naturais (2ª Série)* 25 (no prelo).
2. RYU, D.D.Y. and M. MANDELS (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91-102.
3. WOOD, D.A., N. CLAYDON, K.J. DUDLEY, S.K. STEPHENS and M. ALLAN (1988). Cellulose production in the life cycle of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. In: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. (Aubert, J.-P., Bequin, P. and Millet, J., eds.), pp. 53-70, Academic Press, New York.
4. CNA - Comissão Nacional do Ambiente (1982). Resíduos Sólidos Urbanos. In: *Inventariação dos Resíduos Nacionais*, Vol.1.
5. COLAÇO, M.T.A. (s/data). A produção de S.C.P. a partir de resíduos celulósicos de origem agro-industrial. *Alimentação*: 20-25.
6. BOSE, R.G. (1963). A modified cellulosic medium for the isolation of cellulolytic fungi from infected materials and soils. *Nature (London)* 198: 505-506.
7. COUTTS, A.D. and R.E. SMITH (1976). Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 819-825.
8. SMITH, R.E. (1977). Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 980-981.
9. RAUTELA, G.S. and E.B. COWLING (1966). Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiol.* 14: 892-898.
10. TANSEY, M.R. (1971). Agar-diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Arch. Mikrobiol.* 77: 1-11.
11. HOTTEN, P.M., K.L. JONES and J.M. GRAINGER (1983). The application of a mathematical model to an appraisal of the cellulose-azure method for determining cellulase activity. *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 344-349.