

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

***Trichoderma* spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas
celulolíticas**

Camila Cristiane Pansa

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2017**

Camila Cristiane Pansa
Bacharel em Ciências Biológicas

***Trichoderma* spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas
celulolíticas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Pansa, Camila Cristiane

Trichoderma spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas
celulolíticas/ Camila Cristiane Pansa. - - versão revisada de acordo com a
resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

97 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”.

1. Floresta Amazônica 2. *Trichoderma* 3. Celulose 4. Bagaço de cana-de-
açúcar 5. Enzima I. Título

Ofereço

*Aos meus pais, Maria e Rafael, pela educação,
Carinho e amor que sempre me deram,
Pelo quanto contribuíram com a minha formação,
E por acreditarem sempre em mim,
Sem eles nada disso seria possível. Amo vocês!*

Dedico

*Ao meu companheiro e meu melhor amigo Caio,
companheiro em todos os momentos, por todo amor e
apoio incondicional. É um prazer poder trilhar meu
caminho e alcançar cada sonho com você ao meu lado!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus pela vida e aos constantes ensinamentos.

Ao meu orientador Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação e por acreditar no meu trabalho, obrigada!

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado;

À Embrapa Meio Ambiente, pela infraestrutura oferecida para realização da pesquisa,

À Ana Gabriele, pelos ensinamentos, pela amizade, pelas risadas, pela confiança em me indicar ao professor Itamar, enfim por tudo, muito obrigada!

À minha irmã de coração Fernanda, que sempre esteve presente em todos momentos, que sempre acreditou e me apoio incondicionalmente. Você faz toda diferença em minha vida. Obrigada!

Aos amigos de longa data, Amanda e Wesley, que sempre se mostraram verdadeiros amigos.

As meninas, Bononi (Noni) e Marta (Martinha) vulgo fofurinhas, pelo companheirismo e amizade, pelas risadas e constantes conversas, por toda ajuda. Vocês tornaram os dias mais fáceis. Muito obrigada, adoro vocês!

Ao Wallace, por sua amizade, e por sua alegria vibrante e constante, esses detalhes tornaram os dias mais alegres!

A Dafini e Mayara Sonehara, pela amizade e por toda ajuda. Meu muito obrigada!

A Josiane (Josi) e Bruno (Bruno da Bahia), que se demonstraram verdadeiros amigos nesta etapa final, foram como anjos em meu caminho. Minha eterna gratidão!

Aos colegas e amigos do LMA que tornam a rotina de trabalho mais agradável: Harold, Carol, Ana Paula, Rayza, Maikê, Jorge (vulgo Aragão), Stalin, Tamires, Fábio, Danilo, Rafael, Taketani, Nathália, Diego, Suikinai, enfim todos participaram do meu dia a dia de alguma forma, muito obrigada!

Aos amigos e técnicos de Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente; Rosely, Elke, Márcia, Ana Maria, João e Tatiana, meu eterno agradecimento pelos ensinamentos, paciência e risadas.

E não poderia faltar os meus queridos amigos, os que estiveram presente desde o início da minha caminhada, e que sempre torceram por mim; Allan (Vulgo Carrera), Daiane Ayres (Daia), Diego (Vulgo Jesus), Fabiola Duzo (Fah), Jorge (Vulgo Careca), Juan Felipe, Letícia (Sra. Bazani), Letícia Marcati, Letícia Rocha (Lê) Mariele (Mah), Marcos Cipolleta (Marquinhos), Mateus (Sr. Bazani), Nathália (Nah), Nayara (vulgo Pereirão), Nivaldo (vulgo New), Paulo (Vulgo bigode), Plínio (vulgo 3,14 Pi), Rafael (Rafa), Rafael (Mota), Renata (Re Robles), Samara (Sah), Tais Jorge (Tah). Vocês tornaram as lutas diárias mais fáceis. O meu mais sincero obrigado!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano de verdade continua misterioso diante dos meus olhos” (Isaac Newton)

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria,
Aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.” (Guimarães Rosa)*

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 FLORESTA AMAZÔNICA E BIODIVERSIDADE.....	19
2.2 O GÊNERO <i>TRICHODERMA</i>	19
2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO FUNGO <i>TRICHODERMA</i>	21
2.4 CELULOSE.....	22
2.5 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	24
2.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	26
2.6 APLICAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	28
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 ÁREAS DE COLETA DE SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA.....	31
4.2 ANÁLISE DO SOLO	33
4.3 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. DE SOLOS	33
4.3.1 Isolamento de linhagens de <i>Trichoderma</i>	33
4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP.....	35
4.4.1 Linhagem de referência	35
4.4.2 Triagem qualitativa e quantitativa.....	35
4.4.3 Atividade celulolítica em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS SOLOS	41
5.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS <i>TRICHODERMA</i>	43

5.2.1 Obtenção dos isolados.....	43
5.2.3 Caracterização molecular dos isolados	44
5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DAS LINHAGENS DE <i>TRICHODERMA</i>	58
5.3.1 Triagem qualitativa	58
5.3.2 Triagem quantitativa	62
5.4 ANÁLISES ENZIMÁTICAS DE <i>TRICHODERMA</i> COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO.....	63
5.4.1 Atividade de celulase total.....	63
5.4.2 Atividade de Endoglucanase	66
5.4.3 Atividade da Exoglucanase	70
5.4.4 Atividade da β -glicosidase.....	73
5.4.5 Considerações gerais sobre as linhagens amazônicas e o potencial celulolítico...	75
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	95

RESUMO

***Trichoderma* spp. de solos da Floresta Amazônica como fonte de enzimas celulolíticas**

A Floresta Amazônica, o maior bioma brasileiro, é caracterizado pela ampla diversidade e heterogeneidade de seus ecossistemas. Os solos amazônicos, em geral, abrigam elevada diversidade microbiana que desempenha papéis importantes na ciclagem de nutrientes, mediante a decomposição da matéria orgânica. Dentre os micro-organismos, os fungos se destacam como os principais agentes envolvidos na biodegradação. Esses micro-organismos produzem um coquetel de enzimas do complexo celulolítico que são de grande importância biotecnológica. Desse modo, diante da importância econômica dos fungos, o presente trabalho propôs, acessar fungo do gênero *Trichoderma*, obtidos de solos da Floresta Amazônica, na busca por linhagens com alto potencial celulolítico. Assim, a partir de amostras de solos coletados em doze pontos da floresta foram obtidos 151 isolados de *Trichoderma* spp. O sequenciamento do gene que codifica para o de alongação da transcrição alfa-1, evidenciou a prevalência de sete espécies de *Trichoderma*. Do total de isolados, as mais abundantes foram: *Trichoderma spirale* (37%), *Trichoderma strigosum* (22%), *Trichoderma harzianum* (18%) e *Trichoderma asperellum* (17%). As linhagens foram submetidas a triagem para atividade celulolítica. Duas linhagens, *T. harzianum* AMS 23.14 e *T. harzianum* AMS 29.14 apresentaram atividade enzimática superior ao padrão, *T. reesei* RUT C-30 e foram submetidas a avaliação da atividade enzimática em diferentes condições de cultivos (bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado, em dois pHs: 3 e 5). Foi observado atividade superior das linhagens amazônicas para as três enzimas estudadas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase), quando comparadas à linhagem padrão utilizada. A atividade enzimática foi positivamente influenciada pelo pH ácido, assim como pelo substrato não tratado. A partir destes resultados é notório que as linhagens isoladas desse bioma possuem grande potencial de atividade celulolítica, e que estudos mais aprofundados podem proporcionar o futuro emprego desses fungos em diversas áreas industriais.

Palavras-chave: Floresta Amazônica; *Trichoderma*; Celulase; Biodiversidade

ABSTRACT

***Trichoderma* spp. from Amazon Forest soils as source of cellulolytic enzymes**

The Amazon Rain Forest, the largest Brazilian biome, is characterized by the wide diversity and heterogeneity of its ecosystems. Amazonian soils, in general, harbor high microbial diversity that plays important roles in the cycling of nutrients, through the decomposition of organic matter. Among the microorganisms, fungi stand out as biodegradation agents. These microorganisms produce cellulolytic enzymes that are of great economic and biotechnological importance. The present work proposed to access the fungal population of the genus *Trichoderma*, isolated from Amazonian Forest soils, in the search for lineages with high potential of cellulolytic activity. Twelve soil samples were collected, resulting in the isolation of 151 strains of *Trichoderma* spp. Gene sequencing of the alpha-1 transcription elongation factor region with the EF1 and TEFR primers evidenced the prevalence of seven *Trichoderma* species. Of the total isolates, *Trichoderma spirale* (37%), *Trichoderma strigosum* (22%), *Trichoderma harzianum* (18%) and *Trichoderma asperellum* (17%) were the most abundant. The strains were screened for qualitative cellulolytic activity in solid medium and quantitative in liquid medium. Two strains, *T. harzianum* AMS 23.14 and *T. harzianum* AMS 29.14 showed enzymatic activity superior to *T. reesei* RUT C-30, and were sent to the evaluation of the enzymatic activity in different conditions (sugarcane bagasse treated and untreated, in two pHs: 3 and 5). Superior activity of the Amazonian strains was observed for the three enzymes studied (endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase) when compared to the *T. reesei* RUT C-30 standard. The enzymatic activity was positively influenced by pH 3, as well as by the untreated substrate. From these results, it is well known that isolated strains of the Amazonian environment have a great potential for cellulolytic activity, and that further studies may provide the future employment of these strains in several areas of industry.

Keywords: Amazon rain forest; *Trichoderma*; Cellulase; Biodiversity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DE VIDA ASSEXUAL DE <i>TRICHODERMA</i> SP. ADAPTADO DE KRUGER E BACCHI (1995).....	20
FIGURA 2. <i>TRICHODERMA</i> SP. ISOLADO DE SOLOS AMAZÔNICO COM 4 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E INICIANDO ESPORULAÇÃO.....	21
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DAS FIBRAS DE CELULOSE (KONDO ET. AL., 1997)	23
FIGURA 4. ESTRUTURA CELULÓSICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICO, ILUSTRANDO A EXTREMIDADE REDUTORA E NÃO REDUTORA DA CELULOSE E A CELOBIOSE FORMADA PELA UNIÃO DE DUAS MOLÉCULAS DE GLICOSE (ADAPTADO DE ZHANG & LYND, 2004; VILELA, 2013).....	24
FIGURA 5 CRESCIMENTO DA PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NO ESTADO DE SÃO PAULO. FONTE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) / PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL (PAM).	25
FIGURA 6 ATUAÇÃO DAS ENZIMAS DO COMPLEXO CELULOLÍTICO NA ESTRUTURA DE CELULOSE (BORTOLAZZO, 2011).	27
FIGURA 7. MAPA DA LOCALIZAÇÃO DOS 12 PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO DO ESTADO DO AMAZONAS.	31
FIGURA 8. LOCAIS DE COLETAS. A – AS ESTRADAS DE ACESSO; B E C – SOLOS EM MEIO A MATA FECHADA DE 30 A 40 METROS ADENTRO DA FLORESTA, A PARTIR DA ESTRADA DE ACESSO; D – LAGOS ENCONTRADOS NO DECORRER DAS ESTRADAS DE ACESSO; E - SOLOS DE MATA FECHADA DE 30 A 40 METROS ADENTRO DA FLORESTA PRÓXIMA A UMIDADE DEVIDO A PRESENÇA DE LAGOS; F – SOLO COM ALTA UMIDADE.	32
FIGURA 9. EXEMPLIFICANDO A MONTAGEM DO EXPERIMENTO COM O SUBSTRATO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO E NÃO TRATADO NOS DIFERENTES PH (3 E 5).....	37
FIGURA 10. DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DO FUNGO <i>TRICHODERMA</i> SPP. OBTIDO APÓS O ISOLAMENTO DO SOLO DO ESTADO DO AMAZONAS COM 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C.	43
FIGURA 11. ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NA SEQUÊNCIA DO GENE EF1 E TEFR DOS ISOLADOS DOS SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA. CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE NEIGHBOUR JOINING COM KIMURA 2 PARÂMETROS, ÁRVORE CONSENSO DE <i>BOOTSTRAP</i> UTILIZANDO 1000 REPLICAÇÕES. AS LINHAGENS AMAZÔNICAS SE ENCONTRAM CODIFICADAS COMO AMS.....	49

FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO DO RAMO COLAPSADO REFERENTE AO CLADO 1 (<i>TRICHODERMA SPIRALE</i>) INDICADO ANTERIORMENTE NA FIGURA 10.....	51
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DO RAMO COLAPSADO REFERENTE AO CLADO 2 (<i>TRICHODERMA STRIGOSUM</i>) INDICADO ANTERIORMENTE NA FIGURA 10.	53
FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO DO RAMO COLAPSADO REFERENTE AO CLADO 3 (<i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>) INDICADO ANTERIORMENTE NA FIGURA 12.	54
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DO RAMO COLAPSADO REFERENTE AO CLADO 4 (<i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i>) INDICADO ANTERIORMENTE NA FIGURA 10.	55
FIGURA 16. ABUNDÂNCIA TOTAL DE ESPÉCIES DE <i>TRICHODERMA</i> ISOLADAS DOS SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA.	56
FIGURA 17. ABUNDÂNCIA RELATIVA DE ESPÉCIES DE <i>TRICHODERMA</i> POR PONTO.	57
FIGURA 18. GRÁFICO DE ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA CANÔNICA (CCA). CORRELACIONANDO AS LINHAGENS IDENTIFICADAS E SUA ABUNDÂNCIA COM AS CARACTERÍSTICAS DOS SOLOS.	58
FIGURA 19. A - OBSERVAÇÃO DOS HALOS DA COLÔNIA E DE HIDRÓLISE APÓS COLORAÇÃO COM O VERMELHO CONGO. B- AUSÊNCIA DE HALO APÓS A COLORAÇÃO COM VERMELHO CONGO.	59
FIGURA 20. APRESENTAÇÃO EM PORCENTAGEM DAS LINHAGENS QUE PRODUZIRAM DEGRADAÇÃO DE CELULOSE EM MEIO SÓLIDO COMPARANDO COM O PADRÃO <i>T. REESEI</i> RUT C-30 (26 A 35 MM Ø). A HIDRÓLISE DE CELULOSE FOI QUALIFICADA COM BASE DO HALO PRODUZIDO, SENDO: 01 A 15 MM DE DIÂMETRO, 16 A 25 MM DE DIÂMETRO, 26 A 35 MM DE DIÂMETRO E 36 A 60 MM DE DIÂMETRO.	60
FIGURA 21. PERFIL ENZIMÁTICO DE DEGRADAÇÃO DA CELULOSE TOTAL EM MEIO LÍQUIDO COM PAPEL DE WHATMAN Nº 1, COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO A 30º POR 7 DIAS, PELAS LINHAGENS DE <i>TRICHODERMA</i> SELECIONADAS E ISOLADAS DO SOLO DO ESTADO DO AMAZONAS COMPARADAS COM O PADRÃO RUT C-30.	62
FIGURA 22. ATIVIDADE DE CELULASE TOTAL (FPASE), NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES PH.	64
FIGURA 23. ATIVIDADE DA CELULASE TOTAL (FPASE) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES PH.	65
FIGURA 24. ATIVIDADE DA ENDOGLUCANASE (CMCase) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO NOS PH.	67

FIGURA 25. ATIVIDADE DA ENDOGLUCANASE (CMCase) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES pH.	68
FIGURA 26. ATIVIDADE DA EXOGLUCANASE (Avicelase) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES pH.	70
FIGURA 27. ATIVIDADE DA EXOGLUCANASE (Avicelase) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES pH.	71
FIGURA 28. ATIVIDADE DA B-GLICOSIDASE NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES pH.	73
FIGURA 29. ATIVIDADE DA B-GLICOSIDASE NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO EM DIFERENTES pH.	74
FIGURA 30. ATIVIDADE ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA DAS LINHAGENS AMAZÔNICAS (<i>T. HARZIANUM</i> AMS 29.14 E <i>T. HARZIANUM</i> AMS 23.14) E DO PADRÃO <i>T. REESEI</i> RUT C-30, NO TRATAMENTO PH 3 COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO.	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PRODUÇÃO MUNDIAL DE CANA-DE-AÇÚCAR EM TONELADAS POR ANO. FONTE: AOCDE-FAO.	25
TABELA 2. COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	26
TABELA 3. DADOS GEOGRÁFICOS E DAS TEMPERATURAS REGISTRADAS DA ÁREA DE COLETA DA AMOSTRA DE SOLO NA REGIÃO DA FLORESTA AMAZÔNICA.	32
TABELA 4. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE SOLOS DA AMAZONIA.	41
TABELA 5. CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DOS TRICHODERMA ISOLADOS DOS SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA.	45
TABELA 6 ATIVIDADE CELULOLÍTICA DOS 7% DE ISOLADOS DO ESTADO DO AMAZONAS QUE APRESENTARAM HALO SUPERIOR AO PADRÃO (RUT C-30), CULTIVADOS EM MEIO SINTÉTICO COM CARBOXIMETILCELULOSE (CMC) DURANTE 3 DIAS A 30 °C. ØH = DIÂMETRO DO HALO (MM); ØC = DIÂMETRO DA COLÔNIA (MM); ÍE = ÍNDICE ENZIMÁTICO.	61
TABELA 7. ATIVIDADE DA CELULASE TOTAL ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.	64
TABELA 8. ATIVIDADE DA CELULASE TOTAL ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.	66
TABELA 9. ATIVIDADE DA ENDOGLUCANASE (CMCase) ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.....	67
TABELA 10. ATIVIDADE DA ENDOGLUCANASE (CMCase) ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.....	69
TABELA 11. ATIVIDADE DA EXOGLUCANASE (AVICELASE) ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.....	71
TABELA 12. ATIVIDADE DA EXOGLUCANASE (AVICELASE) ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.....	72

TABELA 13. ATIVIDADE DA B-GLICOSIDASE ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.

..... 73

TABELA 14. ATIVIDADE DA B-GLICOSIDASE ($\mu\text{MOL.ML}^{-1}$) NO MEIO COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO TRATADO COMO SUBSTRATO E ÚNICA FONTE DE CARBONO SOB DIFERENTES PH.

..... 75

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica é conhecida pela elevada biodiversidade e por possuir grande importância econômica, ambiental e cultural. O solo amazônico abriga elevada diversidade microbiana que desempenha papel importante na ciclagem de nutrientes.

Uma fração da diversidade microbiana presente nesse bioma é representada por fungos que participam da decomposição e mineralização dos resíduos orgânicos. Esses resíduos são compostos por celulose – cadeias com alto grau de polimerização que conferem resistência à planta contra o rompimento de parede celular. A degradação da celulose ocorre através da ação de três tipos de enzimas, que interagem de forma sinérgica: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica, as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose e as β -glicosidases, que hidrolisam a celobiose em glicose (LYND et al., 2002). Atualmente, estas enzimas são de grande interesse biotecnológico, sendo empregadas em diversas áreas industriais, tais como: alimentícia, têxtil, fabricação de rações animal, indústria de bebidas (cerveja, vinhos e sucos), além da indústria de papel e na produção de biocombustíveis.

Muitos micro-organismos são capazes de produzir celulases *in vitro*, como *Trichoderma reesei* RUT C-30, o fungo modelo mais utilizado em estudos de atividade enzimática. Entretanto, as quantidades não são satisfatórias para as aplicações industriais, havendo necessidade de prospectar micro-organismos alternativos que produzam quantidades altamente expressivas de enzimas em condições favoráveis e com substratos mais baratos.

Um dos resíduos agrícolas de ampla disponibilidade é o bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com os registros do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), o Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo. Só no ano de 2016, a produção foi de 649 toneladas, a maior produção mundial.

Com o crescimento populacional, a tendência é que ocorra o aumento da produtividade agrícola e, conseqüentemente, o aumento dos resíduos agroindustriais. Estes materiais, quando não utilizados pela indústria na geração de energia através da queima, ocasionam problemas ao meio ambiente quando descartados indevidamente. Um destino alternativo é a utilização desses resíduos para produção de enzimas em larga escala e na produção de bioetanol de segunda geração. O bioetanol é um combustível com custo menos elevado, além de prover menor emissão de gases poluentes, pois o CO₂ emitido é reabsorvido pela cana-de-açúcar, o que torna esse processo ainda mais vantajoso.

Diante da enorme biodiversidade da Floresta Amazônica e da alta concentração de biomassa vegetal depositada nos solos, este trabalho buscou acessar linhagens superiores do

fungo *Trichoderma*, quanto ao seu potencial de hidrólise da celulose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Floresta Amazônica e biodiversidade

A Floresta Amazônica é o maior bioma do Brasil. É considerada, mundialmente, como o grande *hotspot* de biodiversidade do planeta, abrigando mais de 20% das espécies terrestres conhecidas (RAVEN, 1988). Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente, o bioma contém 30 mil espécies de plantas, incluindo 2.500 espécies de árvores que somam um terço de toda a madeira tropical do mundo. Sua bacia hidrográfica é a maior do mundo, com 1.100 afluentes. Seus recursos naturais representam uma fonte abundante de riqueza natural, pois, além da madeira, incluem enormes estoques de borracha, castanha, peixes e minérios, entre outros.

Apesar da exuberante floresta, os solos amazônicos são, em geral, pobres em nutrientes tornando o ecossistema frágil. A fertilidade do solo é naturalmente baixa e a sua manutenção depende basicamente da ciclagem de nutrientes da liteira (CENCIANI et. al., 2009). O solo da Floresta Amazônica abriga elevada biodiversidade microbiana, responsável pela decomposição dos materiais orgânicos com consequente liberação de nutrientes em formas inorgânicas, absorvidos pelas raízes das plantas (CENCIANI, 2009). Os micro-organismos exercem papel fundamental no equilíbrio dos ambientes terrestres e aquáticos da floresta por participarem de ciclagem de importantes nutrientes, tais como carbono, nitrogênio e enxofre (HACKL et al., 2004; WERTZ et al., 2006); de forma que o funcionamento dos ecossistemas terrestres na Amazônia ocorre de forma integrada existindo uma co-dependência entre todos seus componentes, e a diminuição ou o desaparecimento de um deles coloca em risco todo seu equilíbrio (MOURA; PELEJA; FARIA, 2011).

2.2 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* (Filo: Ascomycota; Classe: Sordariomycetes; Ordem: Hypocreales; Família: Hypocreaceae), são fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente (HARMAN et al., 2004). São caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas; ou por fragmentação do talo micelial (KRUGER e BACCHI, 1995) (Figura 1).

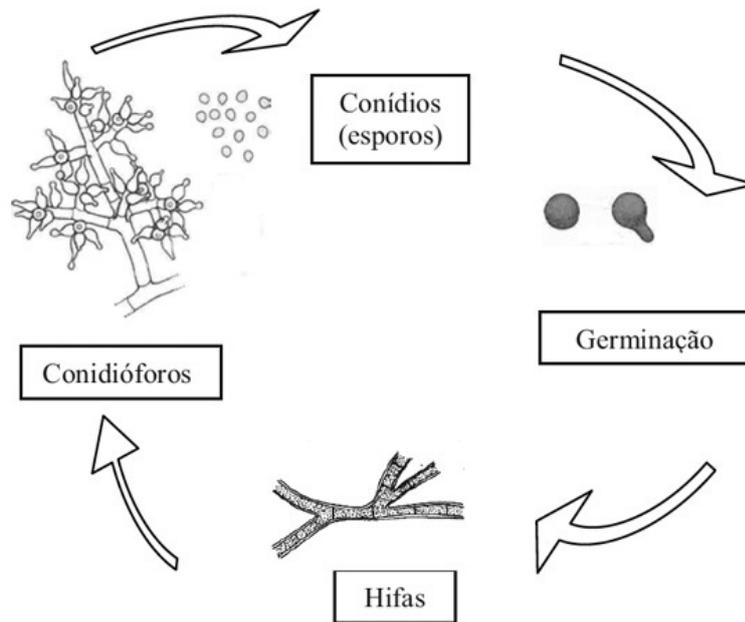


Figura 1. Ciclo de vida assexual de *Trichoderma* sp. adaptado de Kruger e Bacchi (1995)

Fungos do gênero *Trichoderma* são cosmopolitas e apresentam importantes funções ecológicas, pois participam da decomposição e mineralização de resíduos vegetais (MENEZES et al., 2009). Eles estão presentes com frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical, podendo ser isolados das serapilheiras onde estão presentes com grande quantidade de micélio; também colonizam madeira, onde frequentemente é encontrada a fase sexual, teleomórfica (gênero *Hypocrea*) (MACHADO et al., 2012)

A capacidade de se associar às raízes das plantas é um destaque desse gênero. A simbiose ocorre por mecanismos similares aos de fungos micorrízicos (BENITEZ et al., 2004), iniciando-se com a colonização da superfície externa das raízes que se estende por todo o rizoplano, seguida da produção de celulasas (AHMAD; BAKER, 1987) e da invasão da primeira ou da segunda camada de células da epiderme, com a produção de hidrofobinas, que são proteínas que permitem a adesão às superfícies hidrofóbicas (KERSHAW; TALBOT, 1998).

O *Trichoderma* é conhecido por seu crescimento rápido em meio de cultura, apresentando colônias inicialmente com micélio de cor branca, que com o desenvolvimento torna-se cotonoso e compacto com tufo verde (Figura 2), sendo que a coloração da colônia depende da cor e quantidade de conídios produzidos (DOMSH et al., 1980).



Figura 2. *Trichoderma* sp. isolado de solos amazônico com 4 dias de crescimento a 30°C e iniciando esporulação.

Nos primeiros estudos sobre a diversidade de fungos do gênero *Trichoderma* (DANIELSON E DAVEY, 1973; WIDDEN E ABITBOL, 1980; NELSON, 1982), a identificação das espécies era baseada somente em características morfológicas. Recentemente, esses levantamentos passaram a utilizar métodos moleculares, facilitando o trabalho e permitindo identificar cerca de 200 espécies (LÓPEZ-QUINTERO et. al., 2012). Atualmente, novas espécies de *Trichoderma* vêm sendo descritas, como por exemplo, as espécies *Trichoderma attinorum* (LESF 236), *Trichoderma texanum* (LESF 551) e *Trichoderma longifalidicum* (LESF 552) (MONTROYA, 2016). Outros autores também têm descrito novas espécies de *Trichoderma* nos últimos anos (BISSET et al., 2002; KIM et al., 2013; PARK et al., 2014; ZHU & ZHUANG, 2015). A diversidade de espécies desse gênero ainda não é totalmente conhecida, e a descoberta de novas espécies pode ampliar a possibilidade de exploração de seu grande potencial biotecnológico.

2.3 Potencial biotecnológico do fungo *Trichoderma*

Dos fungos que demonstram grande potencial biotecnológico, o gênero *Trichoderma* é um dos mais pesquisados e estudados, principalmente para o controle biológico de fitopatógenos (HARMAN, 2005). Desde a descoberta do potencial deste gênero, muitos estudos foram realizados e ainda são conduzidos para melhor conhecê-lo e aplicá-lo.

O gênero *Trichoderma* também possui destaque no potencial na promoção do crescimento em plantas (HARMAN, 2005; MOHAMED & HAGGAG, 2006, FORTES et al. 2007), além da produção de diversos compostos metabólicos (REINO, 2008; MOHIDDIN,

2010; (HARMAN, 2006). Algumas espécies produzem uma substância volátil (6-pentil-alfa-pirona) de odor característico, semelhante a coco (BROTMAN; GUPTA; VITERBO, 2010), sendo usada como aromatizante nas indústrias alimentícias. Atualmente, estes fungos são considerados de grande importância econômica; existindo no mercado diversas marcas de produtos agrícolas à base de isolados de *Trichoderma* (BETTIOL; MORANDI, 2008).

No início da década de 90 diversos estudos foram realizados para avaliar o potencial enzimático deste fungo, evidenciando resultados benéficos principalmente nas plantas, onde a ação das suas enzimas estimulava a resistência sistêmica (HARMAN, 2005). Dentre as enzimas produzidas, a produção das celulasas e xilanasas (MENEZES, 1997; SILVA et al., 1994) é um destaque devido à habilidade de secretar altas concentrações destas enzimas (SILVA, et al., 1994), o que levou à comercialização (HARGREAVES, 2008).

A espécie *Trichoderma reesei* destaca-se entre os mais potentes produtores de celulasas, sendo a linhagem RUT C-30 a mais utilizada industrialmente, considerado “hipercelulolítico”. Atualmente, muitas cepas utilizadas em escala comercial foram derivadas deste único isolado, coletado na Ilhas Salomão durante a Segunda Guerra Mundial (REESE et al., 1984; ELGOGARY et al. 1990). Ao longo dos anos, o *T. reesei* foi melhorado por mutagênese aleatória resultando em produtividade enzimática melhorada (MANDELS et al., 1971, MONTENECOURT & EVELEIGH 1979; CHERRY & FIDANTSEF, 2003). Além do melhoramento, este fungo é conhecido por ser menos sensível à repressão por glicose, o que lhe confere vantagem em comparação a outras linhagens (MONTENECOURT & EVELEIGH 1979; SINGHANIA et al., 2010; SIPOS et al., 2010). A pesquisa com fungos do gênero *Trichoderma*, é hoje em dia, focada no aumento da eficiência da produção de coquetel enzimático, com a finalidade de reduzir os custos totais, principalmente, na produção de bioetanol a partir de material celulósico (KUMAR et al., 2008).

2.4 Celulose

A celulose é o material natural renovável mais abundante no mundo, sendo o componente mais importante da parede celular das plantas conferindo estrutura (GIGER-REVERDIN, 1995). Além de, proteção osmótica e resistência mecânica as células. (BAYER&LAMED, 1992).

As fibras de celulose representa de 35 a 50% do peso seco das plantas (BAYER&LAMED, 1992) e encontram-se numa matriz complexa, protegida pela parede de hemicelulose e lignina (Figura 3).

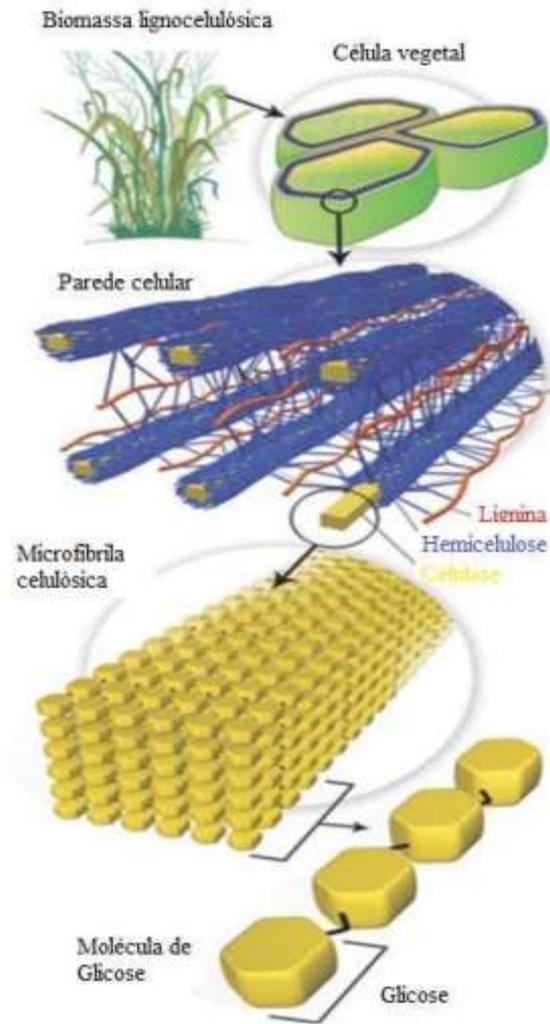


Figura 3. Ilustração da localização das fibras de celulose (KONDO et. al., 1997)

Esse homopolissacarídeo é composto por cadeias com alto grau de polimerização contendo 4.000 a 15.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas. Cada par dessa ligação é definida como celobiose. O polímero apresenta alta resistência, dificultando seu rompimento por substâncias químicas (GIGER-REVERDIN, 1995), por exemplo, em tratamentos como a combinação de ácidos (diluídos ou não) sob pressão e temperaturas muito elevadas (HARGREAVES, 2008). Este polímero apresenta uma extremidade redutora e uma extremidade não redutora (Figura 4).

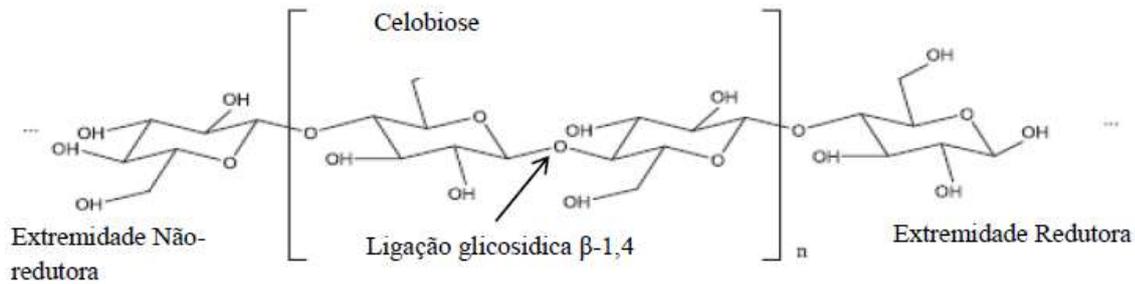


Figura 4. Estrutura celulósica de materiais lignocelulósicos, ilustrando a extremidade redutora e não redutora da celulose e a Celobiose formada pela união de duas moléculas de glicose (adaptado de ZHANG & LYND, 2004; VILELA, 2013).

Estima-se que a produção anual de celulose no mundo, através da atividade agrícola é de 100 bilhões de toneladas (ZHAO et al., 2007). E com o setor do agronegócio crescendo tão intensamente no Brasil, seus resíduos também acabaram chamando a atenção pelas mais diversas utilidades (biocombustíveis, adubo, alimentação animal, produção de enzimas, dentre outros). Por isso, o aproveitamento dos rejeitos tem sido discutido em diversas vertentes (ROSA et al., 2011). Além disso, com a grande preocupação na preservação do meio ambiente, passou-se a pensar muito na sustentabilidade do sistema e no aproveitamento dos resíduos agroindustriais gerados (ZHAO et al., 2007); uma vez que, na maioria dos casos, os resíduos descartados não são tratados e apresentam potencial risco de contaminação dos solos e águas.

2.5 Bagaço de Cana-de-açúcar

Com o aumento da demanda energética no mundo, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm atraído a atenção. Por esse motivo, os materiais de origem lignocelulolítica proveniente da atividade agrícola como o bagaço de cana-de-açúcar, palha, madeira, restos de culturas de grãos e frutíferas, têm sido aproveitados visando à utilização nos processos para renovação energética (AGUIAR, 2008).

O Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, conforme resultados obtidos na base de dados agri-outlook.org, e o primeiro em utilização da cana-de-açúcar para energia (Tabela 1).

Tabela 1. Produção mundial de cana-de-açúcar em toneladas por ano. Fonte: AOCDE-FAO.

Países	Produção de cana-de-açúcar em toneladas por ano						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Brasil	620	559	588	652	632	661	649
Índia	292	342	361	341	352	353	357
China	110	114	123	128	129	130	130
Tailândia	68	95	98	100	103	106	109
Paquistão	49	55	58	63	67	67	69
México	51	50	53	63	58	59	60
Colômbia	33	34	33	34	38	38	39
Austrália	27	27	30	30	32	33	34
Filipinas	28	30	32	31	32	32	32
Indonésia	26	24	28	28	28	29	29
Estados Unidos	23	25	27	26	26	28	28

Segundo dados do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), a produção da cana-de-açúcar do ano de 1973 até o ano de 2013 no estado de São Paulo encontrava-se em um constante aumento de produtividade gerando milhões de toneladas (Figura5).



Figura 5 Crescimento da produção de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) / Produção Agrícola Municipal (PAM).

Durante o processamento da cana, o caldo contido nos colmos é separado do bagaço. Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada podem ser gerados cerca de 280 kg de bagaço (NASCIMENTO, 2007). Embora a maior parte do bagaço seja utilizada para fins energéticos, esse material representa um grande potencial para a agroindústria nacional, abrindo espaço para

o desenvolvimento de atividades nobres do que a geração direta de energia (PITARELO, 2007). Esse material é uma das principais biomassas lignocelulósicas que podem ser utilizadas para a conversão de bioprodutos, pois possui alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina (tabela 2). Fácil utilização e tem baixo custo de transporte e armazenagem (PANDEY et al., 2000; OGATA, 2013).

Tabela 2. Composição lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

Componente	Teor (%)
Celulose	26,6 - 54,3
Hemicelulose	14,3 - 24,4
Lignina	22,7 - 29,7

Fonte: Mello Jr. (1989) e Gomes e Alsina (2007)

Entre os possíveis aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar pode-se citar para a produção de papel e celulose, metanol, etanol, produtos oriundos da hidrólise do bagaço. E a tendência é que ocorra o desenvolvimento de processos biotecnológicos que aumentem a utilização dessa biomassa residual de composição lignocelulósica, principalmente como matéria-prima industrial (VÁSQUEZ et al., 2007).

2.5 Enzimas celulolíticas

As enzimas celulolíticas, conhecidas como celulasas, são biocatalisadoras altamente específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de conversão em etanol (OLSSON e HAHNHAGERDAL, 1996; CASTRO e PEREIRA, 2010).

A hidrólise da celulose é possível por meio da ação de três enzimas pertencentes ao complexo celulolítico: endo-1,4- β -D-glicanase (endoglucanase ou endocelulase), exo-1,4- β -D-glicanase (exoglucanase) e β -glicosidase (beta-glicosidase ou celobiase) (HAMADA et al., 1999).

As endoglucanases constituem um grupo de celulasas representadas como 1,4- β -D-glicana-4-glicanohidrase (EC 3.2.1.4), que atuam de forma aleatória sobre a fibra de celulose. Estas enzimas são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES et al., 2004).

As exocelulasas ou exoglucanases são também conhecidas como celodextrinases ou celobiohidrolases, agem sobre os oligossacarídeos gerados pela endoglucanases, e são

importantes para a hidrólise da celulose cristalina, pois atuam de forma gradual na diminuição do grau de polimerização gerando moléculas de celobiose, permitindo a ação da β -glicosidase (KRUUS *et al.*, 1995). As exoglucanases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. Essa ação promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulasas (ZHANG e LYND, 2004). As exoglucanases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. Ainda, as exoglucanases, podem sofrer inibição por seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de grande importância a atuação simultânea de outras enzimas do complexo celulolítico (BON *et al.*, 2008).

Por fim, as β -glicosidases, também conhecidas como celobiasas hidrolisam a celobiose gerando o produto final, a glicose (LYND *et al.*, 2002; (HARDIMAN *et al.*, 2010; SCHELLER & ULSKOR, 2010; VILELA, 2013) (Figura 6), reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA *et al.*, 2002), além de aumentar o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008).

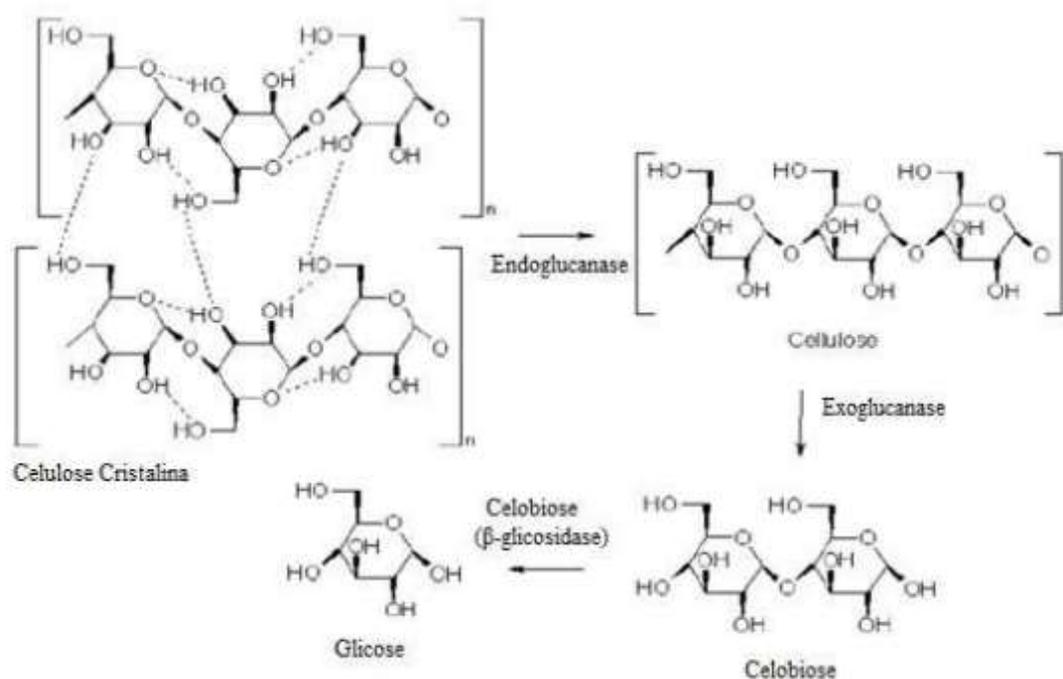


Figura 6 Atuação das enzimas do complexo celulolítico na estrutura de celulose (BORTOLAZZO, 2011).

2.6 Aplicação das enzimas celulolíticas

As celulasas possuem grande importância econômica e biotecnológica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos, indústria médico farmacêutica e biorrefinaria (BHAT e BHAT, 1997; VILELA, 2013).

Na indústria alimentícia essas enzimas são utilizadas na extração de suco de frutas e óleos de grãos, na clarificação de sucos e para aumentar a absorção da água dos cereais (HARGREAVES, 2008). Na indústria de cervejas as celulasas são usadas para hidrolisar L-1,4glucanas presentes no trigo que ajudam na filtração da cerveja e proporcionam melhoria no aroma (BEGUIN e AUBERT, 1994; HARGREAVES, 2008). Na indústria têxtil, a aplicação das celulasas está relacionada à remoção do excesso de corante em jeans (para dar efeito de tecido gasto, *biostoning*), remoção de microfibras que se prendem as malhas de algodão após os ciclos de lavagem, e restauração da maciez e brilho (MANDELS, 1985; TOLAN; FOODY, 1999). Na indústria de biocombustíveis as celulasas são utilizadas para hidrolisar a celulose liberando os açúcares, os quais são fermentados e posteriormente para formação do bioetanol (LIMAYEN & RICK, 2012).

O uso de enzimas é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Elas apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis (ROCHA, 2010). O mercado de celulasas deverá expandir-se quando forem usadas para hidrolisar materiais lignocelulósicos pré-tratados em açúcares, que podem ser fermentados para gerar etanol de 2ª geração e produtos com base biológica em larga escala (CHERRY e FIDANTSEF, 2003; HIMMEL et al., 1999; VAN BEILEN e LI, 2002).

Portanto, o que se busca principalmente pelas indústrias é o aumento volumétrico da produção das enzimas com substratos mais baratos e a produção de preparados enzimáticos com maior estabilidade para cada processo específico e maior atividade específica sobre substratos sólidos (MOREIRA, 2005).

3 OBJETIVOS

Objetivo

- Avaliar o potencial celulolítico do fungo *Trichoderma* proveniente de solos da Floresta Amazônica.

Objetivos específicos:

- Isolar, seletivamente, fungos do gênero *Trichoderma* spp. a partir de solos de diferentes regiões da Amazônia;
- Caracterizar os isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região do fator de alongação da transcrição alfa-1 utilizando os iniciadores *EF1* e *TEFR*;
- Avaliar os isolados obtidos quanto ao potencial enzimático do complexo celulolítico com o uso de bagaço de cana-de-açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de coleta de solos da Floresta Amazônica

A coleta das amostras de solo foram realizadas no estado do Amazonas no período entre o mês de abril e maio. A partir da cidade de Manaus, três transectos foram realizados, estendendo-se até as cidades de Itacoatiara, Novo Airão e Presidente Figueiredo (Figura 7).

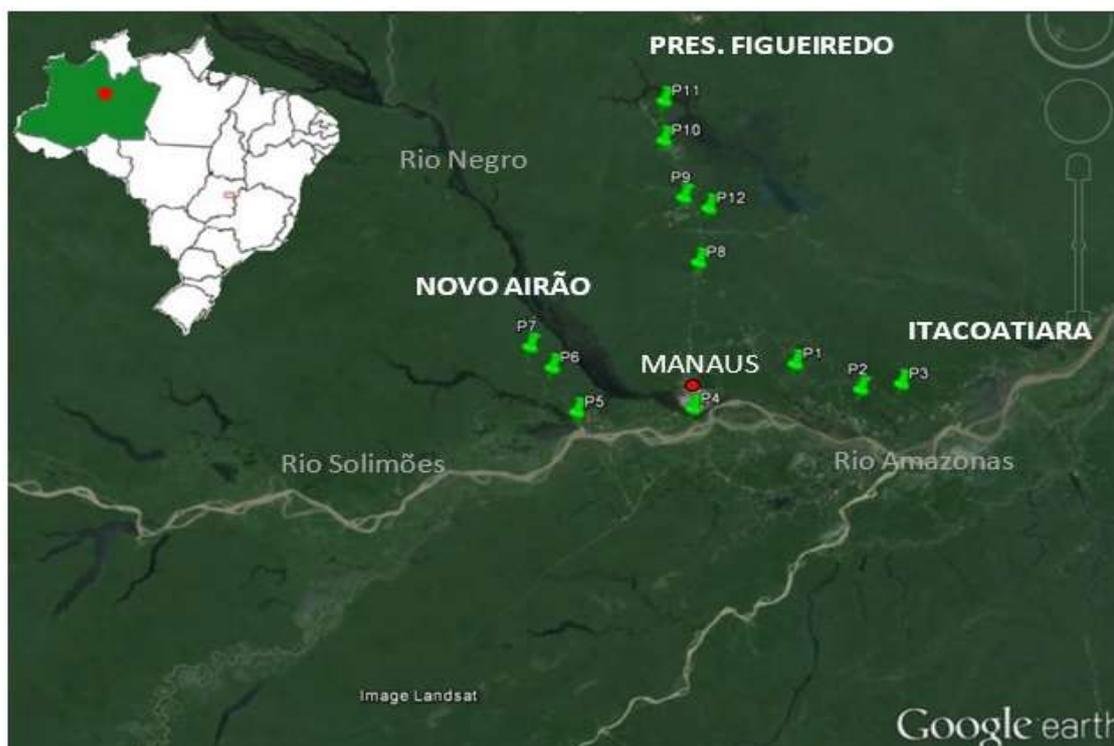


Figura 7. Mapa da localização dos 12 pontos de coleta das amostras de solo do estado do Amazonas.

No decorrer de cada transecto, foi realizada coletas com pontos de 50 à 60 km de distância. Em cada ponto, foram coletadas três sub-amostras com 100 gramas cada, totalizando 300 gramas de amostras de solo por ponto. Para cada ponto a serapilheira foi retirada para obtenção do solo livre de folhas. As amostras de solo foram submetidas a sacos plásticos esterilizados tipo Whril Pak®. Após as coletas, as amostras foram mantidas em isopor com gelo até sua acomodação a 4 °C (material biológico para isolamento). Os dados de temperatura dos solos e do ar foram registrados, e as coordenadas geográficas dos 12 pontos foram georreferenciadas com auxílio de GPS (Tabela 3). Posteriormente, os materiais coletados foram transportados para o Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente, em Jaguariúna, São Paulo.

Tabela 3. Dados geográficos e das temperaturas registradas da área de coleta da amostra de solo na região da Floresta Amazônica.

Pontos	Coordenadas		Elevação (m)	Temperatura do solo (°C)	Temperatura do ar (°C)
	S	W			
AM*S** 1	02°50'58.6"	59°24'52.2"	84	24,8	25
AMS 2	02°54'41.6"	59°02'25.3"	16	28,2	31,4
AMS 3	03°00'45,3"	58°51'13,0"	43	25,5	25
AMS 4	03°07'33.2"	60°00'22.9"	41	24,1	25
AMS 5	03°12'35.3"	60°40'43.3"	53	25,7	26
AMS 6	02°59'21,6"	60°53'36,1"	50	20	25
AMS 7	02°51'36.8"	60°58'10.1"	48	26,2	27
AMS 8	02°17'49.7"	60°02'38.5"	118	24,1	23
AMS 9	01°49'46,1"	60°07'45,3"	107	25,1	25
AMS 10	01°28'40.0"	60°15'10.6"	57	28,7	38
AMS 11	01°28'52,8"	60°15'19.1"	85	25,2	26
AMS 12	01°56'52,4"	60°02'32,1"	146	26,1	27

*AM - Estado do Amazonas e ** solo

A figura 8 ilustra os diferentes ambientes em que as amostras de solos foram obtidas (A, B e C – solos em meio a mata fechada de 30 a 40 metros adentro da floresta, a partir da estrada de acesso; D, E - solos de mata fechada de 30 a 40 metros adentro da floresta próxima a umidade devido a presença de lagos; F – solo com alta umidade).



Figura 8. Locais de coletas. A – As estradas de acesso; B e C – solos em meio a mata fechada de 30 a 40 metros adentro da floresta, a partir da estrada de acesso; D – Lagos encontrados no decorrer das estradas de acesso; E - solos de mata fechada de 30 a 40 metros adentro da floresta próxima a umidade devido a presença de lagos; F – solo com alta umidade.

4.2 Análise do solo

Parte dos solos foram encaminhados ao Laboratório do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / ESALQ-USP de Piracicaba-SP, para realizar as análises físicas e químicas das amostra de solo da Floresta Amazônica.

4.3 Obtenção e identificação de *Trichoderma* spp. de solos

4.3.1 Isolamento de linhagens de *Trichoderma*

Para o isolamento de *Trichoderma* foram utilizados 10 g de solo de cada amostra, homogeneizadas em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) por 2 horas a 120 rpm. As diluições 10^{-2} e 10^{-3} foram realizadas e alíquotas de 100 μ L de cada suspensão foram semeadas no meio TSM seletivo para *Trichoderma* (ELAD et al., 1981) em triplicata para cada ponto. Após o crescimento, fragmentos de micélio das colônias com características morfológicas de *Trichoderma* foram transferidas para o meio de cultivo BDA (ágar, dextrose e batata) e purificadas.

As culturas não puras foram submetidas ao cultivo monospórico, que consistiu na ressuspensão dos esporos em solução salina (NaCl 0,85%) e na realização de diluições seriadas seguido da observação ao microscópio óptico (ZWET et al., 1985). Esse procedimento foi realizado até a obtenção de um número reduzido de esporos o que, por sua vez, favorece a obtenção de uma linhagem pura. As culturas puras foram preservadas pelo método de Castellani (DHINGRA e SINCLAIR 1995).

4.3.2 Caracterização molecular de isolados de *Trichoderma*

As linhagens obtidas de *Trichoderma* foram submetidas à extração de DNA. As linhagens foram crescidas em calda BD (20% batata e 2% dextrose), por 7 dias, em cultura estacionária a 30 °C. Um grama da massa micelial de cada isolado, foi macerada em nitrogênio líquido e o produto submetido ao protocolo do kit MOBIO *UltraClean* Microbial DNA *Isolation* (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 3 μ L do DNA extraído de cada linhagem foram acrescidas de tampão de carregamento e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,5% e corrida eletroforética em tampão TAE 1 X (TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi realizada utilizando fotodocumentador LAB TRADE, com câmera Canon acoplada e a visualização do gel no programa EOS *utility*. O volume de 50 μ L contendo o DNA foi armazenado a temperatura de -20°C até os procedimentos seguintes.

4.3.2.1 Amplificação do DNA de linhagens de *Trichoderma*

Para amplificação por PCR do fragmento do gene que codifica elongação alfa 1, foi utilizado o conjunto de iniciadores *EF1F* e *TEF1R* (CARBONE e KOHN, 1999) o qual gera fragmentos com tamanho esperado de aproximadamente 600 pares de base. A amplificação foi realizada em solução contendo: 2,5µl tampão para reação PCR 10X; 2µl dNTP a 10 mM; 1µ de MgCl₂ a 50 mM; 0,2µ de Taq DNA Polimerase (ABM); 1µ de DNA; 1µl de cada *primer* a 10 mM, e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador AB *Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle*, nas seguintes condições: 94°C/2min; 15 ciclos de 94°C/30 seg, 65°C/30 seg, 72°/1 min; seguido de mais 35 ciclos de 94°C/30 seg, 48°C/30 seg, 72°C/1; extensão final a 72°C/5 min (CARBONE e KOHN, 1990 e SAMUELS et al., 2002).

4.3.2.2 Purificação do produto de PCR e reação de sequenciamento

Os produtos de PCR com tamanho aproximado de 500 - 600 pb foram purificados usando o kit *Wizard® SV and PCR Clean-UP System* (promega). As amostras foram quantificada em gel de agarose a 2% com o marcado *Low mass*. E submetidas a reação de sequenciamento usando as seguintes concentrações de reagente: 2µl tampão 5x ABI; 1µl *Primer*; 1µl *BigDye*; 1µl DNA e água ultrapura (Millipore) ajustada para o volume final de 10µl, sendo a reação realizada em termociclador AB *Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle*, nas seguintes condições 96°C/1min; 35 ciclos de 96°C/15seg, 50°C/15 seg, 60°C/4 min; 4°C infinito, após o término as amostras foram precipitadas e ressuspendida com 10µl de formamida HIDI.

4.3.2.3 Análise das sequências e construção da árvore filogenética de isolados de *Trichoderma*

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice Phrep de qualidade < 20) e reunidas em *contigs* por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) em sistema operacional Linux. Posteriormente, essas sequências foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando a ferramenta *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção de árvores filogenéticas, pelo método de Neighbour Joining com Kimura 2 parâmetros, as sequências

obtidas e outras sequências selecionadas do bancos de dados públicos, foram alinhadas e editadas usando o pacote de programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2011).

4.4 Avaliação do potencial celulolítico de isolados de *Trichoderma* spp.

4.4.1 Linhagem de referência

Para todas as análises enzimática realizadas neste trabalho, foi utilizado como linhagem de referência, o mutante hiper-celulolítico *Trichoderma reesei* RUT-C30, uma das linhagens mais comercializáveis (MANDELS ET AL. 1971; MON- TENECOURT e EVELEIGH 1979; CHERRY e FIDANTSEF 2003; MONTENECOURT & EVELEIGH 1979). Esta linhagem, foi adquirida junto a coleção de trabalho da Embrapa Meio Ambiente que detém um dos maiores acervos de micro-organismos de importância agrícola a Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental, credenciada como Instituição “fiel depositária” de componente do patrimônio genético (O61/2012/CGEN).

4.4.2 Triagem qualitativa e quantitativa

4.4.2.1 Triagem qualitativa

Os isolados obtidos do solo amazônico e o padrão utilizado (*T. reesei* RUT C-30) foram submetidos a uma seleção de linhagens produtoras de celulase em placa, utilizando-se o meio CMC (NaNO₃ – 0,5 g; K₂HPO₄ – 1 g; MgSO₄ 7H₂O – 0,5 g; FeSO₄ 7H₂O – 0,01 g; Extrato de Levedura – 1 g, CMC – 10 g; ágar – 15 g, q.s.p. H₂O 1 L e suplementado com 1 mL de Triton 100X). Após o crescimento, por 3 dias a 30 °C, uma solução de vermelho congo (0,01 % v/v) foi aplicada sobre a placa de Petri. Após 15 min, a placa foi lavada com solução de NaCl a 1M, evidenciando o halo de degradação de celulose e permitindo sua medição.

4.4.2.2 Triagem quantitativa

Para obtenção dos extratos enzimáticos, os isolados fúngicos foram incubados por sete dias em meio BDA para esporulação. Em seguida, foi adicionada sobre o micélio solução de NaCl a 0,85%, e com auxílio da alça de Drigalski os esporos foram liberados do micélio. Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e, em seguida, foi efetuado o ajuste da concentração para 1×10^7 esporos. Um mililitro da solução com esporos foi inoculado em 9 mL de caldo sintético (NaNO₃: 3,0 g.L⁻¹; K₂HPO₄: 1,0 g.L⁻¹; MgSO₄: 0,5 g.L⁻¹; KCl: 0,5 g.L⁻¹ e FeSO₄.7H₂O: 10,0 mg.L⁻¹, pH 5,0) contendo uma fita de papel de filtro Whatman nº 1, de 10

cm², como única fonte de carbono (Figura x). O ensaio foi realizado em tubos de vidro de 15 cm de altura, em triplicata e incubados por 7 dias a 30°C.

4.4.2.3 Quantificação da atividade de celulase total

Após o período de incubação, a atividade da celulase em papel de filtro foi determinada a partir do caldo de cultivo obtido. O volume de 0,5 mL do caldo foi adicionado em tubo de ensaio contendo uma fita de papel de filtro de 6 cm², complementado com 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após adição dos componentes no tubo de ensaio os mesmos foram submetidos a reação incubados por 60 min a 50°C, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL do reagente de DNS (ácido dinitro salicílico) que é composto por 10,0 g.L⁻¹; NaOH: 16,0 g.L⁻¹ e 300,0 g.L⁻¹ tartarato duplo de sódio e potássio (MILLER, 1959). Para desenvolvimento da cor, os tubos foram aquecidos por 5 min em banho de água fervente. Os açúcares redutores foram determinados em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 540 nm. As leituras foram comparadas com o tubo do branco qual não havia inóculo do fungo, obtido nas mesmas condições, contudo, sem inóculo (ATTILI, 1994), de acordo com Ruegger et al. (2004).

4.4.3 Atividade celulolítica em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar

4.4.3.1 Preparo do meio de cultivo para produção enzimática

Para produção de enzimas celulolíticas em bagaço de cana de açúcar foi preparado o meio de cultura líquido de Mandels (Ureia 0,30 g.L⁻¹, extrato de levedura 0,25 g.L⁻¹, peptona bacteriológica 0,75 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1,4 g.L⁻¹; K₂HPO₄: 2,0 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O: 0,3 g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O: 0,4 g.L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O: 1,4 mg; FeSO₄.7H₂O 5,0 mg; CoCl₂.6H₂O: 2,0 mg; MnSO₄.H₂O: 1,04 mg). O volume de 50 mL deste meio foi adicionado em Erlenmeyer, os quais foram acrescidos de 1% (*m/v*) de bagaço de cana-de-açúcar não tratado (natural) e tratado. O bagaço de cana-de-açúcar tratado foi fornecido pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), localizado na cidade de Campinas, o qual realizou o tratamento deste substrato pelo método com ácido sulfúrico conforme procedimento descrito por Saranto (2015).

O experimento foi separado por tratamentos, sendo um tratamento o bagaço de cana-de-açúcar tratado no pH 3 e pH 5, e outro tratamento com bagaço de cana-de-açúcar não tratado com o pH ajustado para 3 e 5, obtendo-se 4 tratamentos diferentes (Figura 9).

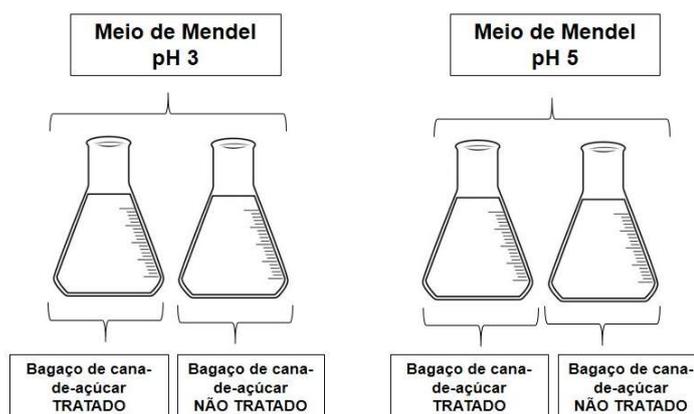


Figura 9. Exemplificando a montagem do experimento com o substrato bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado nos diferentes pH (3 e 5).

Os quatros tratamentos constaram de três repetições. Cada frasco recebeu três discos de micélio (8 mm de diâmetro) de cada linhagem fúngica crescidas por 7 dias em meio de DBA. Os frascos foram incubados a temperatura de 30°C, durante 22 dias. No decorrer do período de incubação foram realizadas 8 coletas (tempo: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 22, dias). Após cada coleta, o conteúdo coletado dos frascos Erlenmeyer foi vertido em tubos do tipo “ependorf” e centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado novamente nas mesmas condições e armazenado a -20°C para realização das quantificações das enzimas.

4.4.3.2 Celulase total

Para cada tempo coletado foi realizada a quantificação da atividade de celulase total conforme método descrito no item 4.3.1.3

4.4.3.3 Endoglucanase

Para a atividade de CMCase, que representa a dosagem de endoglucanase, foi realizada a dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboxi-metil-celulose (0,4 %) (Sigma, EUA) em tampão de citrato de sódio 0,2M com pH 4,8. A reação, então, foi realizada pela adição de 0,5 mL do substrato a 0,5 mL da amostras enzimática e incubados a 50°C por 10 min. Para a conversão da reação foi inoculado 1 mL de DNS e aquecidos 5 min a 100°C. Os açúcares redutores foram determinados em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 540 nm. As leituras foram comparadas com o tubo do branco qual não havia inóculo

do fungo, obtido nas mesmas condições, contudo, sem inóculo (Attili 1994), de acordo com Ruegger et al. (2004).

4.4.3.4 Exoglucanase

A atividade de exoglucanase foi determinada utilizando Avicel 1% diluído em água como substrato. Homogeneizou-se 250 μ L de amostra e 500 μ L da solução Avicel 1%. A solução foi mantida a 50°C por 1 h, e a reação foi interrompida em banho de água fria. Em seguida, a solução foi submetida a centrifugação a $11.200 \times g$ durante 10 min a 4°C. Para a quantificação do teor de açúcares redutores liberados, 250 μ L do sobrenadante foram homogeneizados com 700 μ L de DNS, as amostras foram aquecidas por 5 min a 100°C e a leitura foi realizada em espectrofotometria a 540nm (VILELA, 2013).

4.4.3.5 β -glicosidase

Para a realização da atividade da β -glicosidase foi utilizado o método de Costons e Loomis (1969), adicionando-se 100 μ L de pNPG (15 mM) (pNP- β -D-glicopiranosideo-Sigma), preparado em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 100 μ L do sobrenadante de cultura. A reação foi incubada por 60 minutos a 50°C, e em seguida, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 0,5 M para cessar a reação. As leituras foram determinados em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 410 nm.

4.4.3.6 Curva padrão

A curva padrão para os testes de celulase total (FPase), endoglucanase (CMCase) e exoglucanase (Avicelase) foi estabelecida utilizando-se glicose nas concentrações de 1-20 μ mol.mL⁻¹. As leituras foram utilizadas para construção do gráfico: Absorbância X Concentração de glicose. Obtendo-se a equação da reta, foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática, conforme (Equação 1). Já a curva padrão da β -glicosidase foi realizada, utilizando-se p-nitrofenol-cristalino (Sigma), no lugar da glicose de 1 a 150 mM.

$$\mu\text{mol. mL}^{-1} = \frac{(a \times \text{Abs} + b) \times \text{mL}^{\text{amostra}} \times \text{mmol}^{\text{glicose}}}{\Delta t}$$

Equação 1. Cálculo para obtenção da atividade enzimática em $\mu\text{mol. mL}^{-1}$

Onde,

$\text{Abs} = (\text{Absorbância}_{\text{final}} - \text{Absorbância}_{\text{inicial}})$;

$a =$ Inclinação da reta;

$b =$ Intercepção da reta;

$\text{mL} =$ Volume de amostras enzimática utilizada para a reação da atividade;

$\text{mmol} =$ Molaridade da glicose;

$\Delta t =$ Tempo de reação da atividade.

4.4.3.7 Análise estatística

Para verificar se houve diferenças significativas entre os isolados quanto à degradação da fonte de carbono foi utilizada a análise de variância paramétrica (ANOVA). As linhagens selecionadas foram testadas em três repetições. As comparações das médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com uso do programa Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise físico-química dos solos

Com a finalidade de caracterizar os solos amostrados no Estado do Amazonas foram realizadas análises dos parâmetros físico-químicos dos mesmos cujos resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Análise físico-química das amostras de solos da Amazonia.

SOLOS	FÍSICA				QUÍMICA												
	g kg ⁻¹				mg.dm ⁻³												g.kg ⁻¹
	AT	Silte	Argila	Textura	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	SMP	CTC	V	Fe	Zn	
AMS.1	143	106	751	mt-arg	3,5	28,7	4,7	0,5	1,3	<1	71	74	4	83	0	1,82	
AMS.2	806	29	166	md-arg	3,7	25,7	4,0	0,4	1	<1	47	49	4	48	0	1,03	
AMS.3	901	24	74	ar	3,3	34,0	4,3	0,5	1	<1	82	84	3	143	1	1,16	
AMS.4	773	27	200	md-arg	3,5	32,7	5,3	0,5	1	<1	89	91	2	223	0	1,30	
AMS.5	802	24	174	md-arg	3,6	23,7	4,7	0,7	1	<1	51	54	5	96	0	0,97	
AMS.6	919	24	58	ar	2,8	56,0	5,3	0,6	<1	<1	187	188	0	41	1	1,79	
AMS.7	908	21	71	ar	3,1	23,0	3,3	0,5	<1	<1	61	62	1	67	0	0,85	
AMS.8	113	189	698	mt-arg	3,5	35,3	6,0	0,7	1	<1	107	110	3	133	0	2,26	
AMS.9	290	231	446	arg	3,6	33,0	4,3	0,8	1	<1	140	142	1	110	0	2,14	
AMS.10	567	267	166	md-arg	3,7	46,7	6,0	1,0	<1	<1	55	57	3	76	0	2,27	
AMS.11	572	28	400	arg	3,6	25,3	6,3	0,6	1	<1	64	66	2	90	0	1,62	
AMS.12	561	95	285	md-arg	3,8	61,0	4,3	1,0	1,3	<1	118	121	3	352	1	3,36	

* Areia total (AT); Argila (c/ dispersante) até 149 g/kg = arenosa (ar); 150 a 249 g/kg = média arenosa (md-ar); 250 a 349 g/kg = média argilosa (md-arg); 350 a 599 g/kg = argilosa (arg); 600 g/kg ou superior = muito argilosa (mt-arg). M.O: Matéria orgânica. Acidez potencial (H+Al) extraído com tampão SMP; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação da CTC por bases; (<) menor do que o Limite de quantificação.

O parâmetro pH, é um dos atributos do solo mais descritivos por influenciar as diferentes comunidades microbianas (JURANDY; NOGUEIRA; ANDREOTE, 2016). Christensen (1969) em seu estudo, já relatou que o teor de cálcio no solo e o pH são fatores que regulam a composição da comunidade fúngica, favorecendo o aparecimento de determinadas espécies de fungos como, por exemplo, *Trichoderma* spp. Nos solos amazônicos observou-se alta acidez; variando de pH 2,8 a 3,8, condições típicas encontradas nos solos amazônicos como já demonstrado em trabalhos anteriores (DEMATTÊ; DEMATTÊ, 1993; GON, 2004). Solos de Mata Atlântica, por sua vez, apresentam pH na faixa de 5,5 (LIMA et al, 2012). Este atributo é conhecido por sofrer forte influência do alumínio, cálcio, íons de magnésio e fósforo em solos tropicais, sendo os locais mais ácidos relacionado com teores baixo de fósforo total e concentrações mais elevadas de alumínio (SÁNCHEZ, 1976; FEARNSSIDE, 1984). Quando observado os teores de fósforo dos solos Amazônicos (4 a 6 mg.dm⁻³) com o da Mata Atlântica (7 mg.dm⁻³), por exemplo, apresentam-se mais baixo. Outra influência do pH é afetar a

solubilidade dos minerais no solo, portanto, a disponibilidade de nutrientes. Além de ser um importante fator na atividade dos complexos enzimáticos microbianos, assim como a temperatura (JURANDY; NOGUEIRA; ANDREOTE, 2016). As mudanças no pH do solo sob condições naturais podem alterar a distribuição de espécies de micro-organismos, principalmente fungos (CABELLO; ARAMBARRI, 2002).

Ao observar os atributos físicos do solo, é visível que houve elevado teor de AT (areia total) e argila, quando comparado com silte (Tabela 3). Segundo dados apresentados no boletim informativo da Embrapa Sistema de algodão em 2003, muitos solos do Brasil, principalmente, de regiões tropicais, apesar de apresentarem teores elevados de argila, comportam-se, em termos de retenção de água, como solos arenosos. Isso porque são solos em geral altamente porosos devido ao índice de areia total encontrado em seu interior, o que facilita a passagem de água e sua disponibilidade para as plantas.

O teor de argila geralmente se correlaciona positivamente com a matéria orgânica, sendo que quando aumenta o teor de argila, aumenta o teor da matéria orgânica (LEPSCH, 1980; LENTHE, 1991; DEMATTÊ, 1993). Em outros estudos com solos amazônicos foram observados essa correlação (DEMATTÊ et al., 1993; LEPSCH, 1980). A importância da união da argila com a matéria orgânica está na estabilização dos agregados do solo, possibilitando retenção de nutrientes e minerais (BREMER et al., 1967). Edwards e Bremer (1967) propõem que essa união é possível através dos cátions polivalentes que unem a fração orgânica e os minerais de argila, sem essa união, as frações argila e orgânica dispersam-se, pois ambas têm cargas negativas permanentes (ARENA, 1968). No entanto, no presente trabalho, esta relação não foi observada. O ponto com maior teor de matéria orgânica foi AMS12 (60,0 mg.dm³), este não apresentou o maior teor de argila (285 g.kg de argila), enquanto o ponto AMS1, que apresentou o maior teor de argila (751 g.kg⁻¹ de argila), não apresentou o maior teor de matéria orgânica (28,7 mg.dm³ matéria orgânica), quando comparados com os demais pontos.

A matéria orgânica é responsável por cerca de 50% da CTC de solos arenosos e orgânicos (MATOS, 1996; SANDRÉ, 2000). Ao analisar a tabela 3, os pontos com maiores índices de matéria orgânica possuem os maiores valores de CTC. Os agregados formados por toda dinâmica do solo, são eficientes quando no interior são formados por porções de areia e silte, tornando estes solos menos compactado, o que dá suporte para a aderência microbiana e proporciona condições diferenciadas de aeração e disponibilidade de nutrientes. Fatores que possibilitam a coexistência de milhares de micro-organismos (JURANDY; NOGUEIRA; ANDREOTE, 2016).

O nitrogênio variou de 0,87 e 3,36 g.kg⁻¹ quando comparado os pontos analisados. Este resultado podem estar relacionados com a matéria orgânica disponível no solo. Alguns organismos vegetais possuem níveis de nitrogênio mais elevado que outros, o que influencia no teor disponível deste mineral (LEPSCH, 2011).

Os teores de matéria orgânica nos solos no estado do Amazonas variaram de 23,0 e 61,0 mg.dm⁻³. As diferenças desses valores por ponto podem estar ligadas ao acúmulo diferencial de serapilheira proveniente da vegetação própria de cada ponto, assim como diferentes dinâmicas da microbiota associadas à degradação deste material lignocelulolítico (DINAKARAN; KRISHAYYA, 2010).

5.2 Obtenção dos isolados e caracterização molecular das linhagens *Trichoderma*

5.2.1 Obtenção dos isolados

A partir das 12 amostras de solos coletadas foram obtidos 151 isolados de *Trichoderma* oriundos do meio de cultivo TSM, meio específico para o isolamento seletivo de *Trichoderma* spp. (ELAD et al.,1981). Os fungos foram selecionados com base em suas características morfológicas (coloração, morfologia dos conidióforos e textura do micélio) (Figura 10).



Figura 10. Diversidade morfológica do fungo *Trichoderma* spp. obtido após o isolamento do solo do estado do Amazonas com 6 dias de crescimento a 30°C.

Em um estudo da diversidade de *Trichoderma* conduzido na China, 135 linhagens foram isoladas de amostras coletadas em quatro locais distintos nas regiões norte e sudeste do país (ZHANG et al. 2005). O maior número de linhagens foi encontrado em região árida (41 linhagens), seguida de localidades com clima subtropical (61 e 28 linhagens) e temperado (5 linhagens) (ZHANG et al. 2005). Kubicek et al., (2003) obtiveram 96 linhagens de *Trichoderma* a partir de 19 amostras de solo em um estudo da diversidade de *Trichoderma* no sul da Ásia.

Com base nesses dados, ressalta-se a característica cosmopolita desse gênero fúngico, principalmente em solos (MENEZES et al., 2009) de regiões de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012). Nota-se, no entanto, influência das condições ambientais, como clima e condições físico-químicas do solo na abundância de isolados fúngicos. Ainda, Widden e Abitbol (1980), sugerem que, além desses fatores, os fatores bióticos, como competição com outras espécies também estão relacionadas com a abundância de *Trichoderma*.

5.2.3 Caracterização molecular dos isolados

Foram obtidas sequências da região de elongação alpha-1 dos iniciadores EF1 e TFER, com comprimento maior que 520pb, para as 151 linhagens fúngicas. Comparações das sequências de nucleotídeos com outras depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) revelaram valores de identidade de nucleotídeos variando de 95 a 100% (Tabela 5), permitindo a identificação de 7 espécies: *Trichoderma spirale*, *Trichoderma strigosum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma rogersonii*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma brevicumpactum*. Três isolados não foram associados a espécies já descritas e depositadas no NCBI, sendo então classificados como *Trichoderma* sp. Deve-se mencionar que todos os isolados obtidos no meio de cultivo TSM foram identificados como pertencentes ao gênero *Trichoderma* validando, assim, a eficiência desse meio para isolamento seletivo.

As espécies identificadas no presente trabalho já foram observadas em estudos anteriores por Hoyos-Carvajal et al. (2009) sobre a diversidade de *Trichoderma* das regiões tropicais da Colômbia, incluindo a Floresta Amazônia, e por Lopes-Quintero et al., (2013), em estudos também sobre a diversidade de *Trichoderma* da região Amazônica. Estes autores não observaram a ocorrência das espécies de *T. rogersonii* (AMS 1.10, AMS 15.24 e AMS 15.24a) e *T. brevicumpactum* (AMS 34.13), sendo estas, reportadas pela primeira vez por este estudo no ambiente amazônico. A partir destes resultados, sugere-se que são necessários mais esforços e exploração da diversidade fúngica desta floresta. E considerando o desenvolvimento e avanço das técnicas moleculares, a identificação de fungos de forma independente da morfologia, está cada vez mais rápida e facilitada, levando a um maior conhecimento dos organismos constituintes deste grupo (AVIO et al., 2009)

Tabela 5. Caracterização taxonômica dos *Trichoderma* isolados dos solos da Floresta Amazônica.

Código do isolado	Espécie mais próxima	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Número de acesso no (GenBank)	Código do isolado	Espécie mais próxima	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Número de acesso no (GenBank)
AMS 1.3	<i>Trichoderma virens</i>	100	99	KJ677267	AMS 3.41	<i>Trichoderma spirale</i>	99	100	FJ463370
AMS 1.4	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463319	AMS 4.2	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 1.10	<i>Trichoderma rogersonii</i>	93	94	EU280008	AMS 4.16	<i>Trichoderma harzianum</i>	98	99	FJ463319
AMS 1.42	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162	AMS 4.46	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	99	AY937442
AMS 1.43	<i>Trichoderma asperellum</i>	99	100	KT302162	AMS 5.19	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162
AMS 2.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	96	99	FJ463319	AMS 7.17	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 2.2	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370	AMS 8.3	<i>Trichoderma strigosum</i>	99	99	JQ425703
AMS 2.5	<i>Trichoderma spirale</i>	98	100	FJ463370	AMS 8.7	<i>Trichoderma strigosum</i>	94	99	AY937442
AMS 2.6a	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 8.29	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370
AMS 2.6b	<i>Trichoderma spirale</i>	95	98	FJ463370	AMS 9.1	<i>Trichoderma strigosum</i>	99	99	AY937442
AMS 2.7	<i>Trichoderma spirale</i>	98	99	FJ463370	AMS 9.3	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 2.18a	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463319	AMS 9.7	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162
AMS 2.18b	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	99	AY857300	AMS 9.42	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KP747448
AMS 2.21	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370	AMS 11.7	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370
AMS 2.25	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 11.30	<i>Trichoderma strigosum</i>	97	99	AY937442
AMS 2.30	<i>Trichoderma harzianum</i>	97	99	FJ463319	AMS 12.2	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	99	AY937442
AMS 2.31	<i>Trichoderma harzianum</i>	98	99	FJ463319	AMS 12.4	<i>Trichoderma spirale</i>	100	100	AY857277
AMS 2.33	<i>Trichoderma harzianum</i>	97	99	FJ463314	AMS 12.10	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	99	AY937442
AMS 2.36	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370	AMS 12.13	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	99	AY937442
AMS 2.40	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370	AMS 12.14	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 2.42	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	99	FJ463319	AMS 12.17	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	99	AY937442
AMS 2.43	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162	AMS 12.20	<i>Trichoderma asperellum</i>	99	100	KT302162
AMS 2.50	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463319	AMS 12.23	<i>Trichoderma strigosum</i>	100	99	JQ425703
AMS 2.50	<i>Trichoderma harzianum</i>	96	99	FJ463319	AMS 12.41	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370
AMS 3.2	<i>Trichoderma sp.</i>	81	99	KU301715	AMS 13.14	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463319
AMS 3.7	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370	AMS 13.15	<i>Trichoderma harzianum</i>	100	98	AY857300
AMS 3.33	<i>Trichoderma harzianum</i>	97	99	FJ463319	AMS 14.18	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KT302162
AMS 3.36	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370	AMS 14.22	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	97	AY937442
AMS 3.39	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 14.35	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KP747448

Código do isolado	Espécie mais próxima	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Número de acesso no (GenBank)	Código do isolado	Espécie mais próxima	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Número de acesso no (GenBank)
AMS 15.7	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463314	AMS 21.6	<i>Trichoderma harzianum</i>	95	99	FJ463319
AMS 15.9	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 21.8	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	99	AY937442
AMS 15.10	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	100	AY937442	AMS 21.10	<i>Trichoderma strigosum</i>	94	99	AY937442
AMS 15.19	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KT302162	AMS 21.11	<i>Trichoderma harzianum</i>	95	99	FJ463319
AMS 15.23	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162	AMS 22.1	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	AY750890
AMS 15.24	<i>Trichoderma rogersonii</i>	92	94	EU280008	AMS 22.3	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370
AMS 15.24a	<i>Trichoderma rogersonii</i>	92	94	EU280008	AMS 22.12	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 15.25	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KP747448	AMS 22.40	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370
AMS 16.1	<i>Trichoderma strigosellum</i>	88	95	JQ425705	AMS 23.10	<i>Trichoderma spirale</i>	97	100	FJ463370
AMS 16.16	<i>Trichoderma</i> sp.	80	99	KU301715	AMS 23.12	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	96	AY937442
AMS 16.43	<i>Trichoderma strigosum</i>	100	95	JQ425704	AMS 23.14	<i>Trichoderma harzianum</i>	96	99	FJ463314
AMS 17.2	<i>Trichoderma strigosum</i>	100	96	JQ425703	AMS 23.16	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 17.6	<i>Trichoderma strigosum</i>	94	95	AY937442	AMS 23.40	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162
AMS 17.7	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162	AMS 24.9	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KP747448
AMS 17.16	<i>Trichoderma spirale</i>	98	99	FJ463370	AMS 24.40	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KP747448
AMS 17.40	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 25.1	<i>Trichoderma strigosum</i>	100	100	JQ425717
AMS 17.85	<i>Trichoderma strigosum</i>	100	96	JQ425703	AMS 25.5	<i>Trichoderma spirale</i>	98	100	FJ463370
AMS 18.2a	<i>Trichoderma strigosum</i>	99	96	AY937442	AMS 25.6	<i>Trichoderma spirale</i>	97	100	FJ463370
AMS 18.4	<i>Trichoderma strigosum</i>	94	96	AY937442	AMS 25.7	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KP747448
AMS 18.6	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162	AMS 25.7b	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162
AMS 18.7	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	96	AY937442	AMS 25.8	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162
AMS 18.15	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	97	AY937442	AMS 25.9	<i>Trichoderma strigosum</i>	94	99	AY937442
AMS 18.30	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	96	AY937442	AMS 25.11	<i>Trichoderma harzianum</i>	96	99	FJ463314
AMS 18.31	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	96	AY937442	AMS 25.14	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	99	AY937442
AMS 18.40	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463314	AMS 25.45	<i>Trichoderma spirale</i>	98	99	FJ463370
AMS 19.3	<i>Trichoderma harzianum</i>	96	99	FJ463314	AMS 25.46	<i>Trichoderma spirale</i>	99	100	FJ463370
AMS 19.40	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	99	FJ463319	AMS 26.1	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 20.5	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 26.6	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370
AMS 21.5	<i>Trichoderma harzianum</i>	96	99	FJ463319	AMS 26.7	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370

Código do isolado	Espécie mais próxima	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Número de acesso no (GenBank)	Código do isolado	Espécie mais próxima	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Número de acesso no (GenBank)
AMS 27.1	<i>Trichoderma strigosum</i>	96	99	AY937442	AMS 33.6	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 27.2	<i>Trichoderma spirale</i>	98	99	FJ463370	AMS 33.9	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370
AMS 27.40	<i>Trichoderma asperellum</i>	99	99	KT302162	AMS 33.10	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	99	KP747448
AMS 28.4	<i>Trichoderma spirale</i>	95	98	FJ463370	AMS 33.16	<i>Trichoderma spirale</i>	84	98	EU280049
AMS 28.6	<i>Trichoderma strigosum</i>	97	99	AY937442	AMS 33.42	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370
AMS 28.12	<i>Trichoderma harzianum</i>	95	99	FJ463319	AMS 34.10	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KP747448
AMS 28.16	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370	AMS 34.12	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162
AMS 28.40	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	99	AY937442	AMS 34.13	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	97	94	FJ436131
AMS 28.41	<i>Trichoderma strigosum</i>	98	99	AY937442	AMS 34.4	<i>Trichoderma spirale</i>	98	99	FJ463370
AMS 29.1	<i>Trichoderma sp.</i>	80	99	KU301715	AMS 34.5	<i>Trichoderma spirale</i>	100	98	AY857277
AMS 29.10	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KT302162	AMS 34.40	<i>Trichoderma harzianum</i>	97	99	FJ463314
AMS 29.13	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 34.42	<i>Trichoderma spirale</i>	98	99	KT279030
AMS 29.14	<i>Trichoderma harzianum</i>	95	99	FJ463314	AMS 34.43	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370
AMS 29.40	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	100	KP747448	AMS 35.2	<i>Trichoderma spirale</i>	94	99	FJ463370
AMS 30.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	97	99	FJ463314	AMS 36.2	<i>Trichoderma spirale</i>	100	99	KT279022
AMS 31.2	<i>Trichoderma spirale</i>	99	99	FJ463370	AMS 36.15	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 32.42	<i>Trichoderma spirale</i>	95	99	FJ463370	AMS 36.45	<i>Trichoderma spirale</i>	97	99	FJ463370
AMS 33.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	97	99	FJ463319					

A figura 11 ilustra a árvore filogenética das sequências obtidas e daquelas mais próximas com as do banco de dados. Quatro clados foram colapsados para melhor apresentar as relações filogenéticas. A árvore geral, contendo todas as sequências, encontra-se nos anexos do presente trabalho. A partir da análise filogenética, observou-se que as linhagens fúngicas cultivadas foram, em sua maioria, já isoladas de florestas tropicais e como endófitos.

Dentre as sequências analisadas, *Trichoderma virens* AMS 1.3, não seguiu os padrões de agrupamentos descritos acima, de modo que a sequência desta linhagem afiliou-se com linhagens isoladas de solos de cultivares de mirtilio. *T. virens* é conhecido por seu potencial no biocontrole de fitopatógenos (BAILEY e LUMSDEN, 1998). Outros autores, em estudos sobre a diversidade de *Trichoderma*, observaram a maior incidência e predominância desta espécie em solos de cultivares, sugerindo que estes solos podem ser um habitat favorável a esta espécie. Em estudo realizado na Floresta Amazônica, Hoyo-Carvajal et al. (2009), observaram um único isolado pertencente a espécie *T. virens*, assim como, no presente estudo. A baixa frequência dessa espécie em estudos de regiões florestais, portanto, dá maior suporte a ideia de que tal espécie realmente é favorecida pelo solo de cultivares.

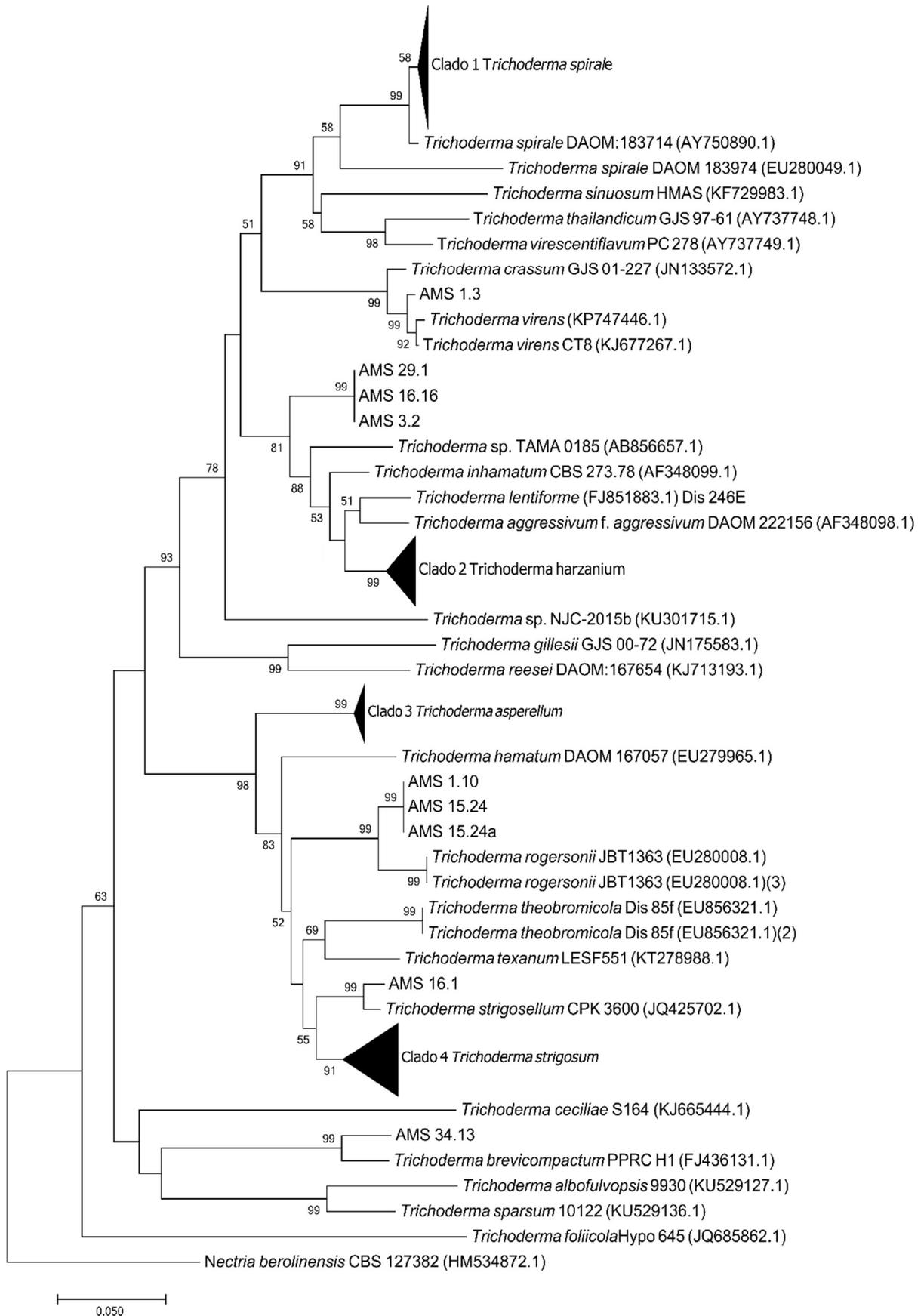


Figura 11. Árvore filogenética baseada na sequência do gene EF1 e TEFr dos isolados dos solos da Floresta Amazônica. Construída pelo método de Neighbour Joining com Kimura 2 parâmetros, árvore consenso de *bootstrap* utilizando 1000 replicações. As linhagens amazônicas se encontram codificadas como AMS.

Novas espécies de *Trichoderma* têm sido reportadas na literatura nos últimos anos (BISSET et al., 2002; KIM et al., 2013; PARK et al., 2014; ZHU & ZHUANG, 2015). Só no ano de 2016 os autores Montoya et al. (2016) descreveram 3 novas espécies de *Trichoderma* (*T. texanum*, *T. attinorum* e *T. longifilialidicum* spp. Nov) de amostras provenientes do Texas/EUA. Com base nesses dados sugere-se que uma gama de espécies pertencentes a este grupo fúngico ainda não foram descritas e que esforços são necessários para o amplo levantamento da diversidade deste gênero, o que pode acarretar na descoberta de novos compostos de ações biotecnológicas, visto a grande quantidade de compostos já descritos para esse gênero (REINO et al., 2008; AMIN et al., 2010). Neste estudo, três sequências (AMS 29.1, AMS 16.16 e AMS 3.2), apresentaram material genético idêntico entres si, sendo afiliadas na mesma posição da árvore (Figura 11), entretanto, não se afiliaram com nenhuma outra espécie. Ainda, quando comparadas com o banco de dados do NCBI, as sequências se associaram com *Trichoderma* sp. com identidade de 99%, porém com uma cobertura de apenas 88%. Portanto o presente trabalho sugere que estes isolados possam ser fortes candidatos a novas espécies. Para tal confirmação, estudos mais detalhados de filogenia e caracterização morfológica são necessários.

Na figura 12, são mostradas as 56 sequências que se afiliaram com *T. spirale*. A porcentagem de identidade destas sequências foram de 98% para duas das sequências (AMS 33.16 e AMS 34.5) e 99% a 100% para as demais (Tabela 5). *T. spirale* foi observado no ambiente amazônico em trabalhos anteriores, sendo considerada uma das mais abundantes (QUINTERO, 2013). Além da observação desta espécie em regiões tropicais, esta espécie também foi observada em outras diferentes localidades do mundo e diferentes ambientes como: Canadá, Ásia, Turquia, China e Tailândia (BISSET, 1991; KUBICEK et al., 2003; CHAVERRI et al., 2003; ZHANG et al., 2005), entretanto não de forma abundante, por este motivo, foi sugerido que esta espécie tem uma preferência por climas tropicais (HOYO-CARVAJAL et al., 2010).

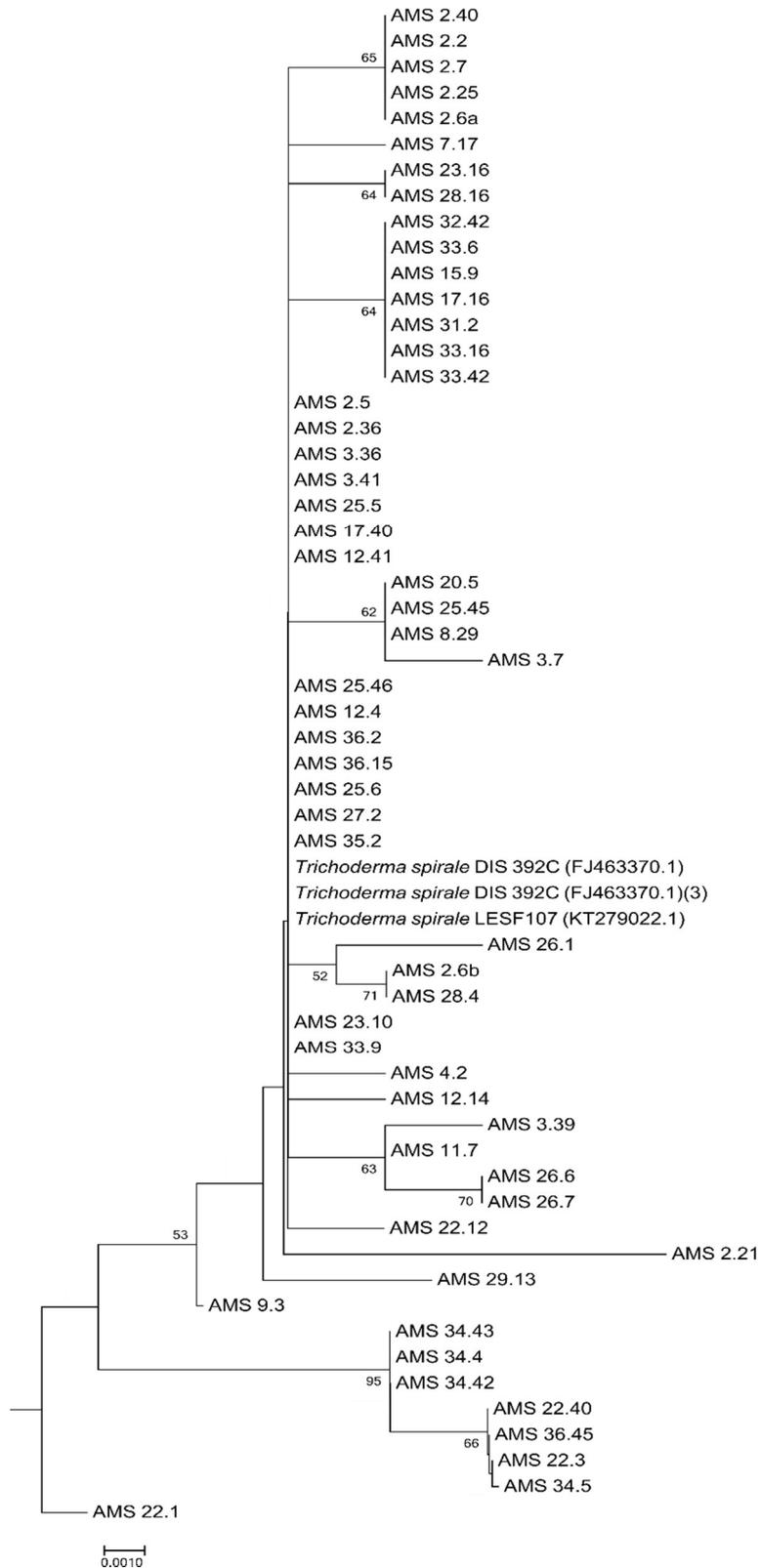


Figura 12. Representação do ramo colapsado referente ao clado 1 (*Trichoderma spirale*) indicado anteriormente na figura 10.

Na figura 13, observamos o ramo que aqui chamamos de clado 4 *T. strigosum* com 36 sequências afiliadas a esta espécie. Destas, onze linhagens apresentaram identidade abaixo de

97% e 25 sequências variaram de 99 a 100%. Nas sequências em que foi observado baixa identidade se agruparam como um ramo intermediário entre *T. strigosum* e *T. strigosellum*. Embora a identificação molecular indique que essas linhagens sejam classificadas como *T. strigosum*, há a possibilidade de que esse ramo seja uma nova espécie, entretanto uma análise morfológica e molecular mais detalhada mostra-se necessária para tentar identificar essa diferenciação específica.

A sequência de *T. strigosum* (JQ425703.1) do banco de dados que afiliou com as sequências dos isolados do presente trabalho, trata-se de uma sequência isolada do ambiente amazônico por López-Quintero et al. (2013) em seu estudo sobre a diversidade de *Trichoderma* da Floresta Amazônica da Colômbia. Neste mesmo estudo, os autores identificaram uma nova espécie associada a *T. strigosum* e nomeada como *T. strigosellum*, sendo estas consideradas como espécies irmãs.

No presente trabalho a sequência do isolado AMS 16.1 se afiliou com *T. strigosellum* e, quando observado o local desta espécie na árvore filogenética colapsada na figura 10, é possível verificar que ambas formaram um clado. Ainda, quando em consulta a literatura, estudos sobre a diversidade e biogeografia de *Trichoderma* em diversas localidades do mundo, como Ásia, China, Tailândia, Himalaia e Rússia (CHAVERRI et al., 2003; KUBICEK et al., 2003; GHERBAY, et al, 2004; DRUZHININA et al., 2005; ZHANG et al., 2005), não foram observadas a presença destas espécies. Deste modo, pode-se sugerir que a espécie *T. strigosum* possa ser endêmica de ambientes tropicais da América Central e Sul, e a espécie *T. strigosellum* endêmica da região Amazônica. Entretanto são necessários mais estudos e levantamentos sobre a diversidade e distribuição do gênero *Trichoderma* em outras localidades e ambientes, para tal confirmação.

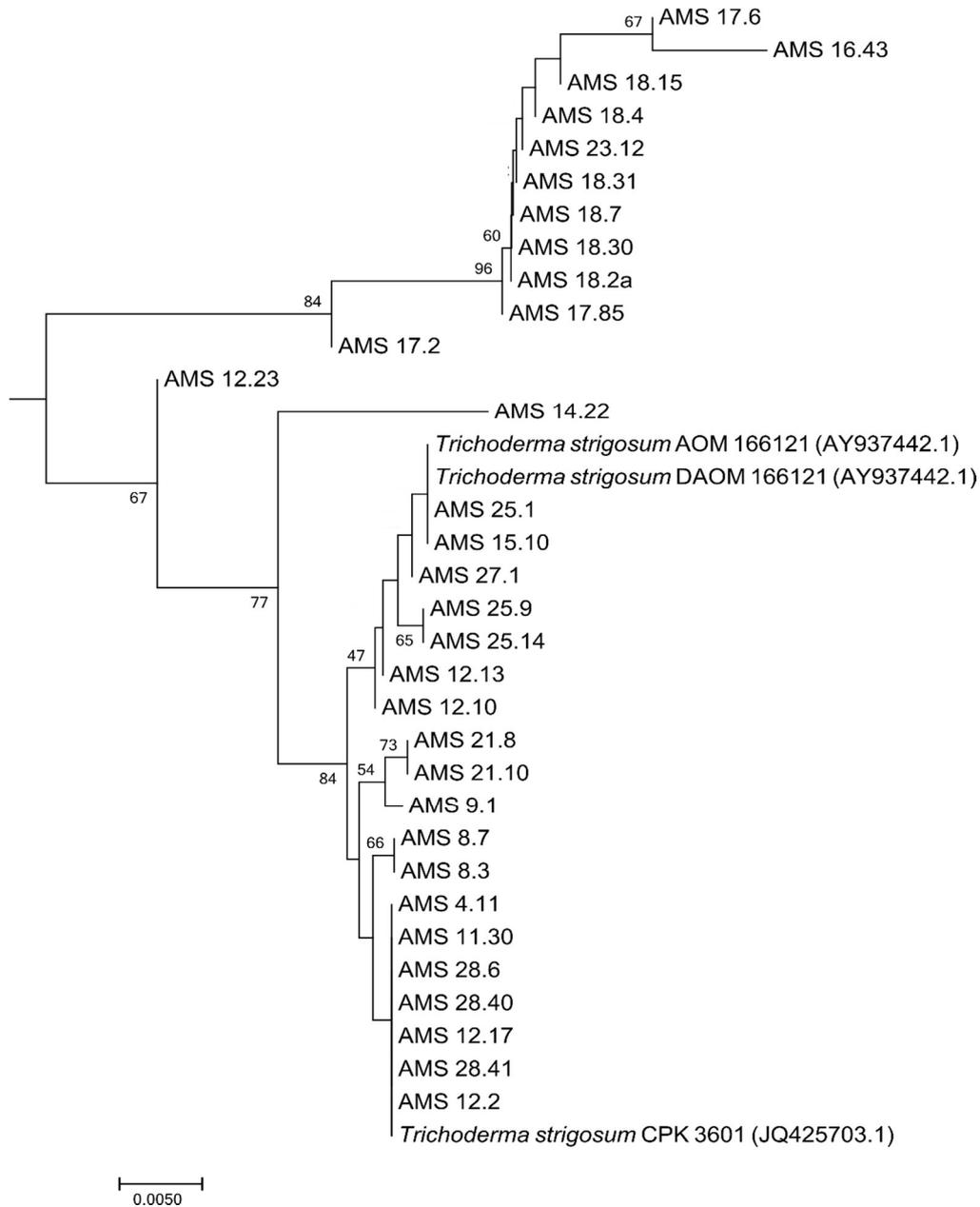


Figura 13. Representação do ramo colapsado referente ao clado 2 (*Trichoderma strigosum*) indicado anteriormente na figura 10.

Vinte e oito sequências se afiliaram com *Trichoderma harzianum*, com 99% de identidade (Figura 14). Acredita-se que o *T. harzianum* possui grande variabilidade genética, o que pode explicar sua habilidade de se estabelecer com predominância em diversas regiões de variados climas (BISSET, 1998 e CHAVERRI et al., 2003). No presente estudo, não foram observadas variações genéticas entre os isolados de *T. harzianum* dos solos Amazônicos, pois todas as sequências agruparam-se, de modo a se localizarem no mesmo ramo. Entretanto as sequências das linhagens AMS 13.14 e AMS 13.15, as quais foram obtidas do mesmo ponto de coleta, foram observadas em um ramo relativamente distante das demais sequências, é possível

que estes isolados possam conter genótipos distintos entre os demais isolados da mesma espécie. Em estudos realizados por Hoyo-Carvajal et al, (2010), com amostras de regiões da América central e sul, incluindo a região amazônica da Colômbia, encontraram isolados de *T. harzianum*, assim como, *T. spirale* e *T. asperellum* com variações entre os genótipos da mesma espécie.

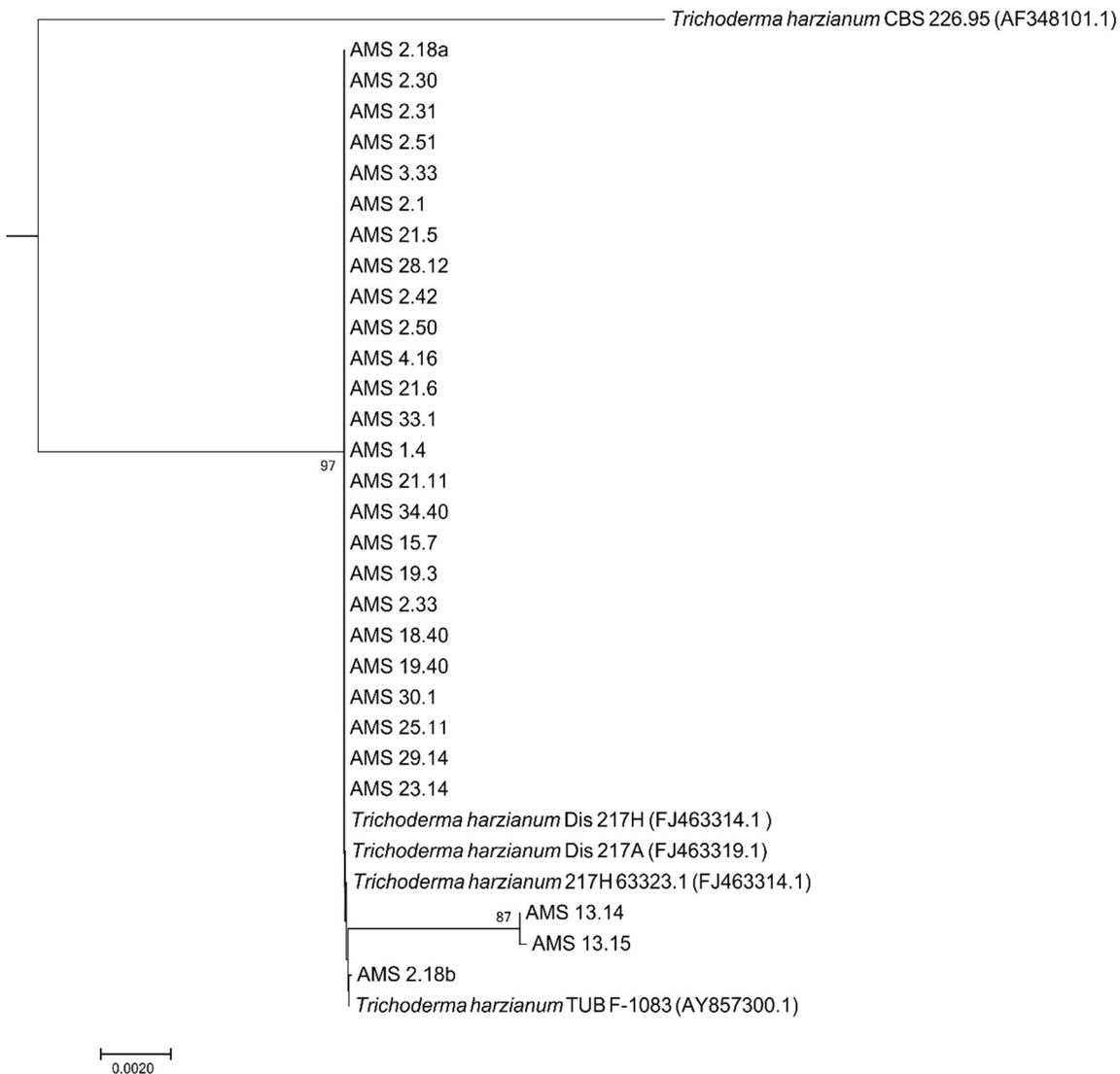


Figura 14. Representação do ramo colapsado referente ao clado 3 (*Trichoderma harzianum*) indicado anteriormente na figura 12.

A espécie *T. harzianum* já foi observada em diversas localidades do mundo, quase sempre em maior abundância (CHAVERRI et al., 2003; KUBICEK et al., 2003; GHERBWAY, et al, 2004; DRUZHININA et al., 2005; ZHANG et al., 2005). Ainda, esta espécie é reconhecida por seu potencial de controle biológico em diversos cultivos

(MACHADO et al., 2012) o que nos mostra sua alta capacidade de adaptação a diversos ambientes.

Na figura 15 é observado o ramo nomeado como clado 6 *T. asperellum*, com vinte e seis sequências que variaram de 99 a 100% de identidade com as do banco de dados (Tabela 5).

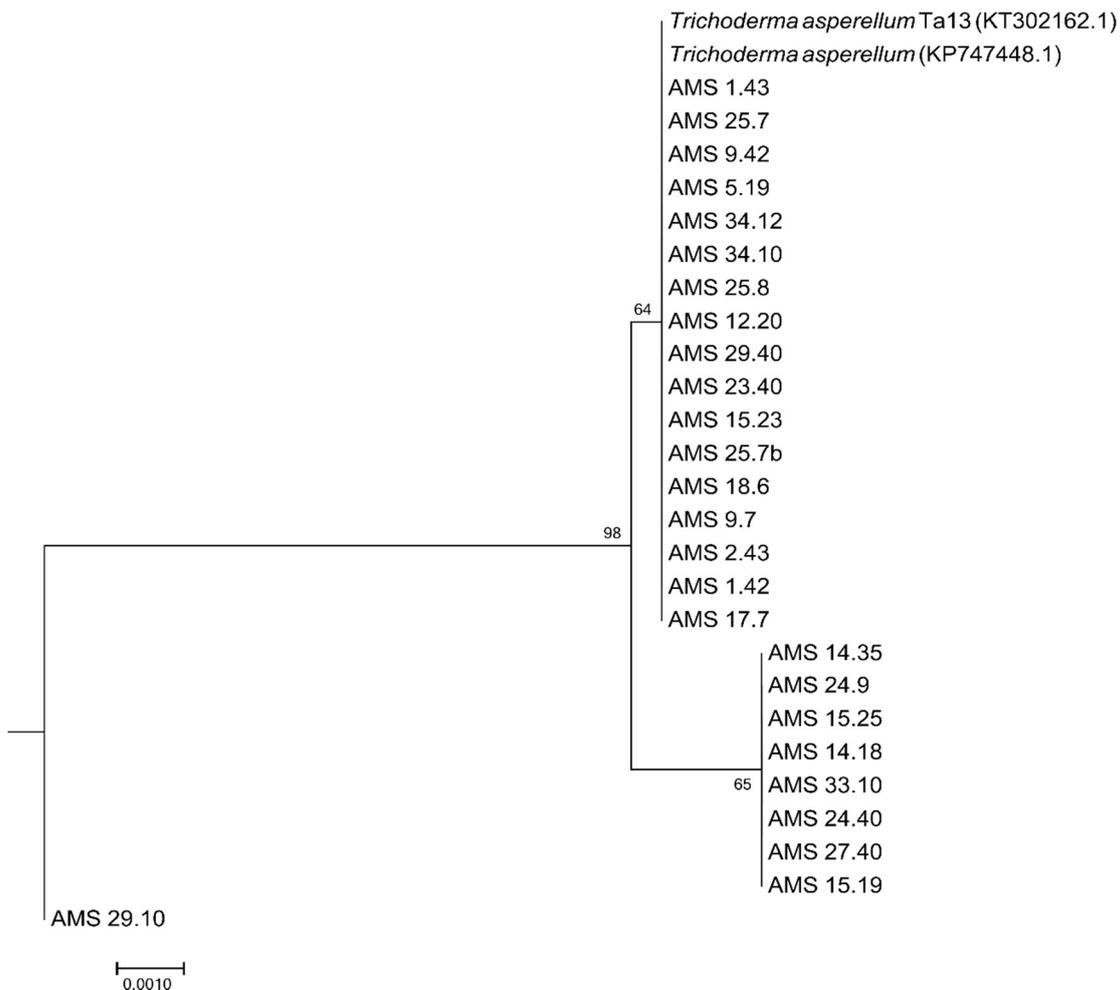


Figura 15. Representação do ramo colapsado referente ao clado 4 (*Trichoderma asperellum*) indicado anteriormente na figura 10.

Esta espécie, também foi observada como uma das mais abundantes em solos da Floresta Amazônica (LOPES-QUINTERO, et al., 2013) e ambientes tropicais (HOYO-CARVAJAL et al, 2010). *T. asperellum* na literatura é citado como um possuidor de padrão de crescimento em substratos recalcitrantes, e correlacionado com a ocorrência em solos relativamente não perturbados de florestas ou outros habitat naturais (HOYO-CARVAJAL et al., 2010). Assim como observado nas áreas amostradas do presente estudo, pois os solo coletados, foram obtidos a partir de regiões não perturbadas da região amazônica. Ainda outra explicação, para tal abundância pode se dar pelo crescimento rápido e esporulação precoce dos isolados de *T.*

spirale, *T. harzianum* e *T. asperellum* (HOYO-CARVAJAL et al., 2010). Entretanto esses autores também sugerem que a predominância das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum* em diversos ambiente na Colômbia, pode ser explicada pela variabilidade genética que foi encontrada para vários genótipos distinto de cada espécie e sua capacidade correspondente de crescer em vários substratos.

De modo geral, as espécies *T. spirale* (37%), *T. strigosum* (22%), *T. harzianum* (18%) e *T. asperellum* (17%) foram as mais abundantes nesse estudo (Figura 16).

Abundância total das espécies de *Trichoderma*

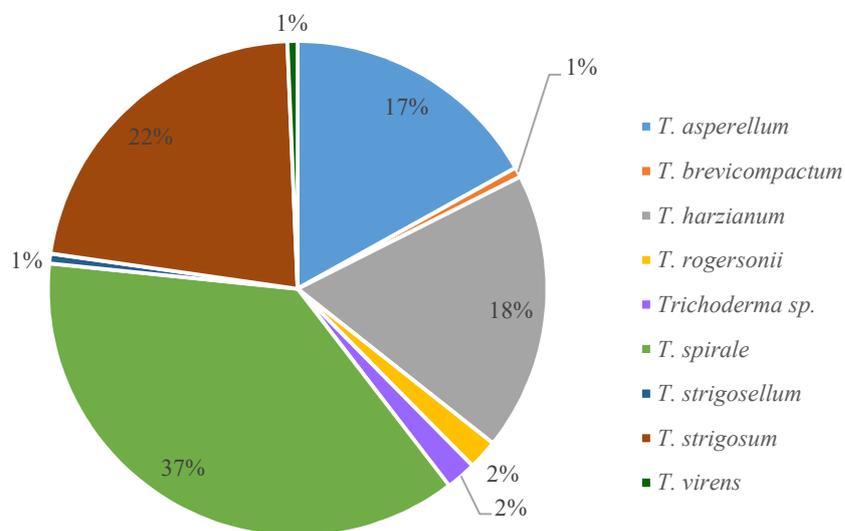


Figura 16. Abundância total de espécies de *Trichoderma* isoladas dos solos da Floresta Amazônica.

Outros autores, trabalhando com diversidade de *Trichoderma* na Tunísia, observaram *T. harzianum* como a espécie mais abundante (SADFI-ZOUAOUI et al, 2009). Já Kubicke et al., (2003), além de encontrarem *T. harzianum*, observaram também *T. spirale*, em seu trabalho na Ásia. Estas espécies (*T. spirale* e *T. harzianum*), também já foram observadas na Rússia, Sibéria e Himalaya (Kullnig et al. (2000) e são reportadas como totalmente cosmopolitas, principalmente *T. harzianum* (CHAVERRI et al., 2003).

T. asperellum, que também foi encontrado em abundância nesse trabalho, é considerado comum em diversos ambientes e climas (HERMOSA et al., 2004; JAKLITSCH et al., 2006). Em estudos de regiões tropicais na Colômbia, Hoyo-Carvajal (2013) também observaram a predominância desta espécie. Estes autores sugerem que as regiões tropicais possuam uma

biodiversidade relativamente alta de *Trichoderma* e que as espécies *T. asperellum* e *T. harzianum* são as mais predominantes.

Com a identificação das espécies isoladas, foi possível analisar a abundância relativa das espécies de *Trichoderma* de cada área amostrada (Figura 17).

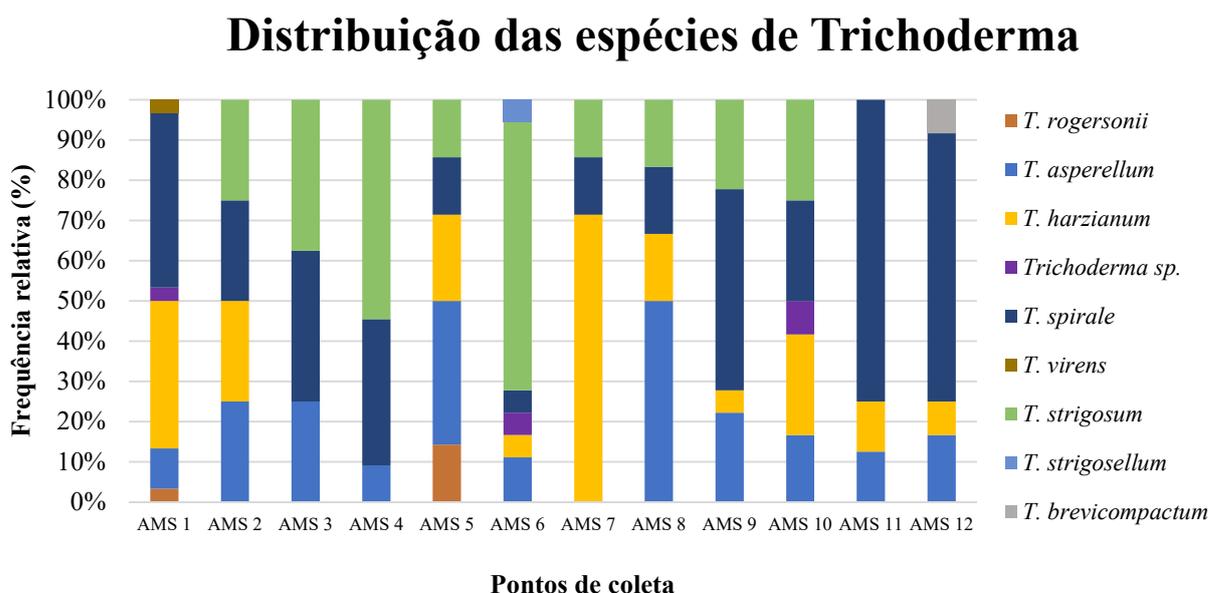


Figura 17. Abundância relativa de espécies de *Trichoderma* por ponto.

De acordo com figura apresentada, nota-se a ausência de *T. strigosum* nos pontos AMS01, AMS11 e AMS12, enquanto que nos demais essa espécie é observada, com especial destaque para o ponto AMS06 onde é observado em maior abundância (Figura 17). Como demonstrado pelas análises físico-químicas obtidas (Tabela 4), o ponto AMS06 apresenta os menores valores de pH, sugerindo que esta espécie sofra influência de ambientes com pH mais ácido.

A espécie *T. spirale* foi observada em todos os pontos coletados sendo os pontos AMS08, AMS11 e AMS12 aqueles de maior abundância (Figura 16). De acordo com análise de correspondência canônica (CCA) (Figura 18), onde o primeiro eixo explica 56,55%, o estabelecimento e predominância dessa espécie está possivelmente relacionado aos teores elevado de argila, nitrogênio e silte encontrados nesses pontos, assim como, para *T. harzianum* e *T. asperellum*, que estão localizados próximo a *T. spirale*. Já os isolados *T. strigosum* correlacionou-se positivamente com AT (areia total) e acidez potencial (H+Al SMP).

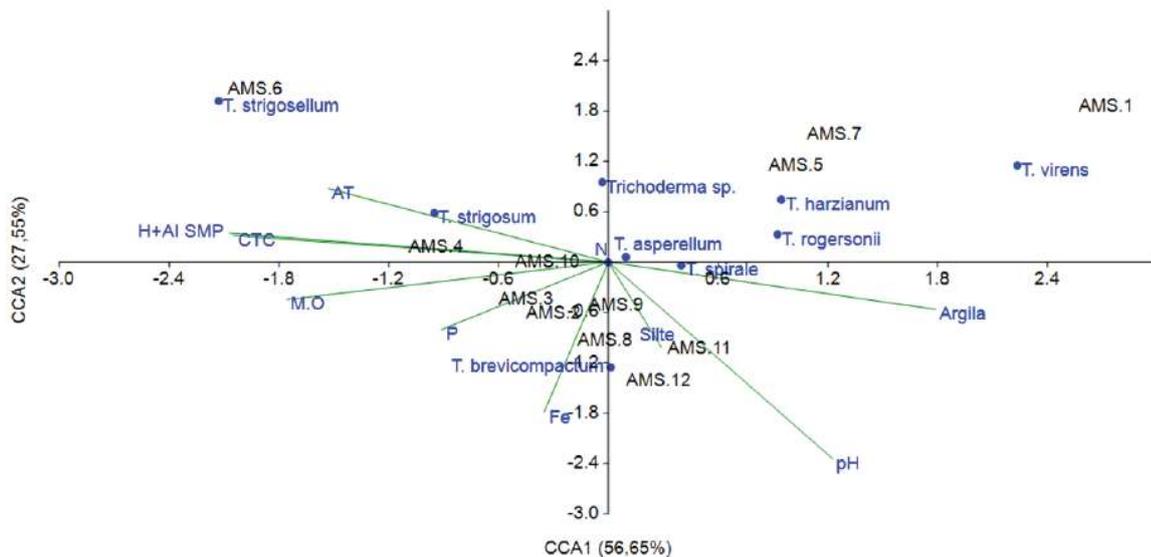


Figura 18. Gráfico de análise de correspondência canônica (CCA). Correlacionando as linhagens identificadas e sua abundância com as características dos solos.

Diferenças na comunidade microbiana associada a fatores químicos do solo têm sido relatados em alguns estudos (DE BELLIS et al., 2007). Além disso, outros estudos relatam que a temperatura e o regime de chuvas de um local sejam fatores determinantes da estrutura das comunidades microbianas do solo e seus processos bioquímicos (MUMMEY et al., 2010). Segundo Matos (2010), não é fácil estabelecer uma relação entre as comunidades de fungos e os fatores ambientais determinantes, já que estes fatores são inúmeros e estão correlacionados com a vegetação. A autora, ainda em seu trabalho, observou que amostras de solo coletadas em pontos distantes mas sob à mesma espécie arbórea, apresentaram estruturas de comunidades de fungos semelhantes evidenciando que existe influência das espécies vegetais sobre as comunidades fúngicas de um local, podendo sugerir no presente trabalho que as relações não explicadas pela análise físico-química podem ser explicadas pelas espécies vegetais do ambiente, entretanto estudos são necessários para tal confirmação.

5.3 Avaliação do potencial celulolítico das linhagens de *Trichoderma*

5.3.1 Triagem qualitativa

Após o período de incubação dos isolados em meio CMC (1%), as placas foram coradas com vermelho congo e o halo de degradação revelado (Figura 19).

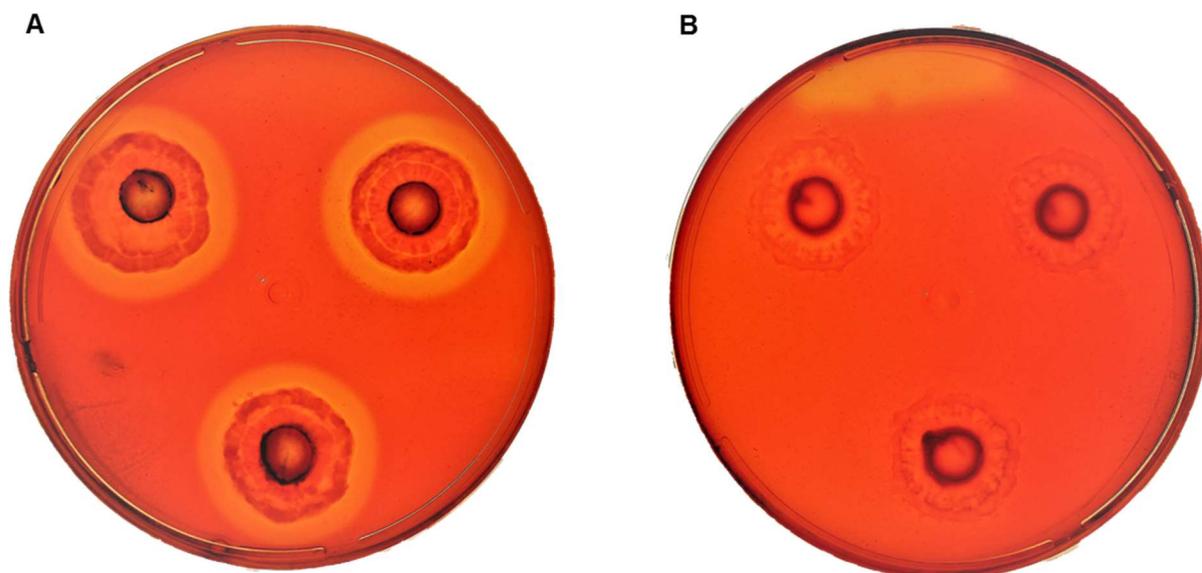


Figura 19. A - Observação dos halos da colônia e de hidrólise após coloração com o vermelho Congo. B- ausência de halo após a coloração com vermelho congo.

O halo evidenciado é formado pela ausência da ligação do corante com as ligações β -1,4 glicídicas (CASTRO, 2006; FLORENCIO, 2011), ou seja, devido à clivagem do CMC em fragmentos menores o corante vermelho Congo não consegue se aderir (FLORENCIO, 2011). Este método é utilizado como ferramenta inicial, simples e rápida que auxilia na seleção de micro-organismos com potencial de produção de enzimas extracelulares (TEN et al., 2004).

A partir dos halos formados, ficou evidenciado que das 151 linhagens isoladas, 103 apresentaram atividade celulolítica em meio sólido. Destas, 63% apresentaram formação de halo similar ao padrão *T. reesei* RUT C-30 (36 mm) e 7% apresentaram halo superior ao padrão (Figura 20).

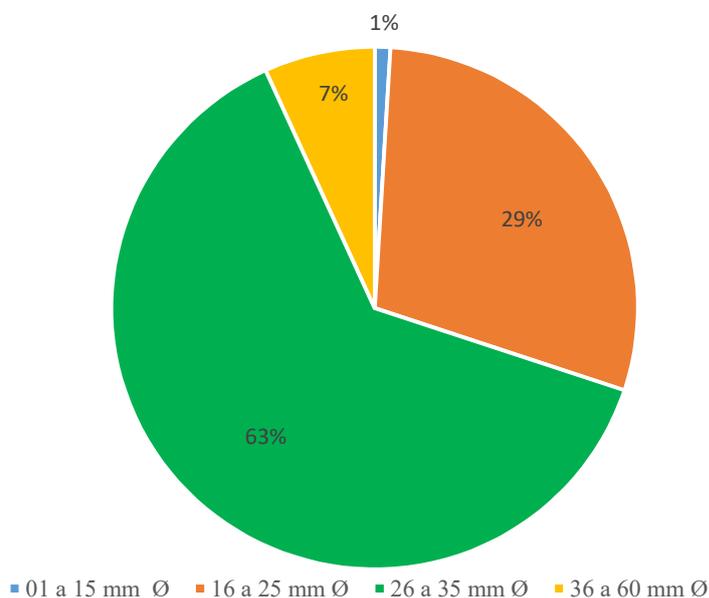


Figura 20. Apresentação em porcentagem das linhagens que produziram degradação de celulose em meio sólido comparando com o padrão *T. reesei* RUT C-30 (26 a 35 mm Ø). A hidrólise de celulose foi qualificada com base do halo produzido, sendo: 01 a 15 mm de diâmetro, 16 a 25 mm de diâmetro, 26 a 35 mm de diâmetro e 36 a 60 mm de diâmetro.

Rugger et al. (2004), trabalhando com linhagens de *Trichoderma harzianum* obtiveram diâmetro de halo de degradação de 72 mm, com incubação de 4 dias em uma temperatura de 28 °C. No presente trabalho, com 3 dias de incubação a 30 °C, foram obtidas linhagens de *Trichoderma* spp. com halo de degradação de até 50 mm (Tabela 6). Ainda, para as linhagens que apresentam halo superior ao padrão *T. reesei* RUT C-30, foi calculado o índice enzimático (Í.e.) (Tabela 6), somando o diâmetro da colônia mais o halo formado, dividindo o resultado pelo valor do diâmetro da colônia segundo metodologia proposta por Furlaneto (1989).

Tabela 6 Atividade celulolítica dos 7% de isolados do estado do Amazonas que apresentaram halo superior ao padrão (RUT C-30), cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) durante 3 dias a 30 °C. Øh = diâmetro do halo (mm); Øc = diâmetro da colônia (mm); Íe = índice enzimático.

Isolados		Øh	Øc	Í.e
Código	Identificação	Incubação: 3 dias		
AMS 5.19	<i>T. spirale</i>	44	23	1,9
AMS 7.22	<i>T. spirale</i>	50	25	2
AMS 14.35	<i>T. asperellum</i>	40	24	1,7
AMS 23.14	<i>T. harzianum</i>	38	23	1,7
AMS 23.16	<i>T. spirale</i>	40	25	1,6
AMS 22.12	<i>T. spirale</i>	50	22	2,3
AMS 29.14	<i>T. harzianum</i>	40	25	1,6
AMS 32.42	<i>T. spirale</i>	36	18	2
AMS 36.2	<i>T. spirale</i>	36	22	1,7
AMS 36.15	<i>T. spirale</i>	36	23	1,9
AMS 36.45	<i>T. spirale</i>	44	24	1,5
RUT C-10	<i>T. reesei</i>	36	23	1,6

De acordo com Ten et al. (2004) o diâmetro do halo de hidrólise é útil para selecionar linhagens com altos níveis de atividade de degradação de celulose. E o índice enzimático pode ser utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial para a produção de enzimas celulolíticas tanto de um grupo da mesma espécie quanto de espécies diferentes.

Florencio (2011), em seu trabalho com linhagens de *Trichoderma*, observou os maiores índices enzimáticos para as linhagens de *Trichoderma harzianum* com valor de 1,50 à 1,74 (Í.e), próximos ao observado no presente trabalho. Outros autores utilizaram desta mesma metodologia para avaliar o índice enzimático de micro-organismos, como *Aspergillus janus* (Í.e de 1,31 à 1,4), *Aspergillus caesiellus* (Í.e de 1,2 à 1,30) *Penicillium bilaii Chalabuta* (Í.e de 1,31 à 1,4) (NOGUEIRA et al., 1996). Estes gêneros de fungos são conhecidos por possuírem alto potencial enzimático, e enzimas já comercializáveis (ORLANDELLI et al., 2012). Os valores encontrados por estes autores foram inferiores ao obtido no presente trabalho pelas linhagens de *Trichoderma* spp isoladas do solo Amazônico que variaram de 1,5 a 2,3 no índice enzimático, destacando a importância desse ecossistema na busca por micro-organismos com potencial aplicação biotecnológica.

5.3.2 Triagem quantitativa

As 103 linhagens selecionadas pela formação do halo de degradação em meio sólido foram submetidas à quantificação da celulase total com papel de Whatman nº1, com a finalidade de selecionar as linhagens com maior potencial celulolítico sob condições líquidas de cultivo. Destas, 9 linhagens (AMS 2.31; AMS 3.36; AMS 4.20; AMS 7.17; AMS 23.14; AMS 25.13; AMS 29.14; AMS 32.19 e AMS 36.45) apresentaram atividade de celulase total equivalente à do padrão *T. reesei* RUT C-30 ($0,43 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) enquanto duas linhagens (*T. harzianum* AMS 23.14 e *T. harzianum* AMS 29.14) apresentaram atividade significativamente ($p < 0,05$) superior ao do padrão com $0,5$ e $0,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de atividade, respectivamente (Figura 21), selecionadas para as próximas análises.

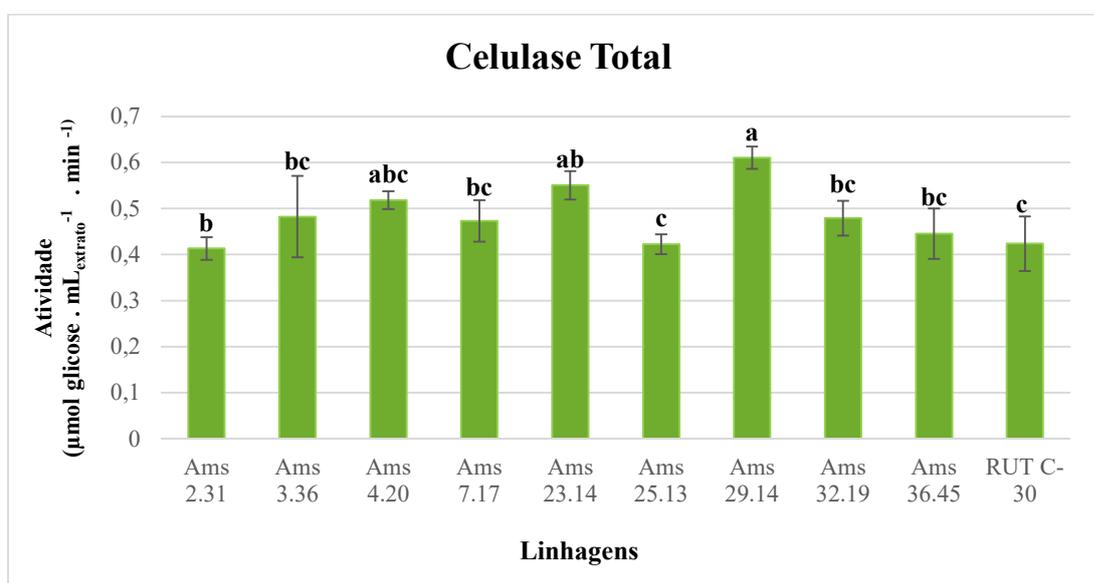


Figura 21. Perfil enzimático de degradação da celulose total em meio líquido com papel de Whatman nº 1, como única fonte de carbono a 30° por 7 dias, pelas linhagens de *Trichoderma* selecionadas e isoladas do solo do estado do Amazonas comparadas com o padrão RUT C-30.

Em um estudo similar realizado por Basso et al. (2010), utilizando a linhagem *Trichoderma reesei* QM9414, sob as condições de 28°C por 10 dias obtiveram atividade enzimática de celulase total em papel de Whatman nº1 de até $0,2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, valores inferiores aos obtidos neste trabalho. Esses autores ainda compararam a atividade de celulase total entre duas linhagens padrão, o *T. reesei* RUT C-30 e o *Trichoderma reesei* QM9414, e observaram que a linhagem *Trichoderma reesei* QM9414 apresentou melhor atividade ($0,2 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) quando comparado com a linhagem *T. reesei* RUT C-30 ($0,1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$), os resultados destes autores foram inferiores aos apresentados pelas linhagens amazônicas do presente estudo.

Trichoderma reesei destaca-se entre os mais potentes produtores de celulases, sendo a linhagem RUT C-30 (*T. reesei*), melhorado geneticamente, resultando em produtividade enzimática hiperceulolítica (MANDELS et al., 1971, MONTENECOURT e EVELEIGH 1979; CHERRY e FIDANTSEF, 2003), considerado hoje a mais utilizada industrialmente, por seu potencial hiperceulolítico. E as novas linhagens de *Trichoderma* isoladas dos solos Amazônicos estão demonstrando atividade superior a essas cepas, evidenciando que os solos Amazônicos necessitam de mais exploração na busca por potenciais biotecnológico.

5.4 Análises enzimáticas de *Trichoderma* com bagaço de cana-de-açúcar como substrato

A produtividade de uma enzima, assim como o custo de produção, podem ser otimizados, analisando-se e modificando os fatores físicos e químicos utilizados no processo (SAID, PIETRO, 2004 e LOPES 2009).

Desta maneira, nos testes a seguir, buscou-se avaliar a atividade enzimática das linhagens Amazônicas no pH 3, o qual, trata-se da condição do ambiente em que as linhagens foram isoladas (DEMATTE; DEMATTE, 1993), e no pH 5, a faixa mais usual para produção e atividade enzimática por linhagens fúngicas. Utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar como substrato e única fonte de carbono, visto que trata-se de um resíduo agroindustrial de maior predominância (CASTRO et al., 2010).

5.4.1 Atividade de celulase total

A atividade da celulase total em meio suplementado com bagaço de cana de açúcar tratado foi maior em todos os períodos para as linhagens amazônicas nos dois pHs (3 e 5), quando comparadas com a linhagem padrão *T. reesei* RUT C-30 (Figura 22). O pH 3 proporcionou melhor atividade enzimática, assim como o período de 22 dias. Nesse cenário, a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou atividade de 2,38 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ e a linhagem *T. harzianum* AMS 29.14 apresentou 1,75 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$, valores significativamente ($p < 0,05$) superiores ao da linhagem padrão (*T. reesei* RUT C-30) que apresentou 0,93 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Tabela 7).

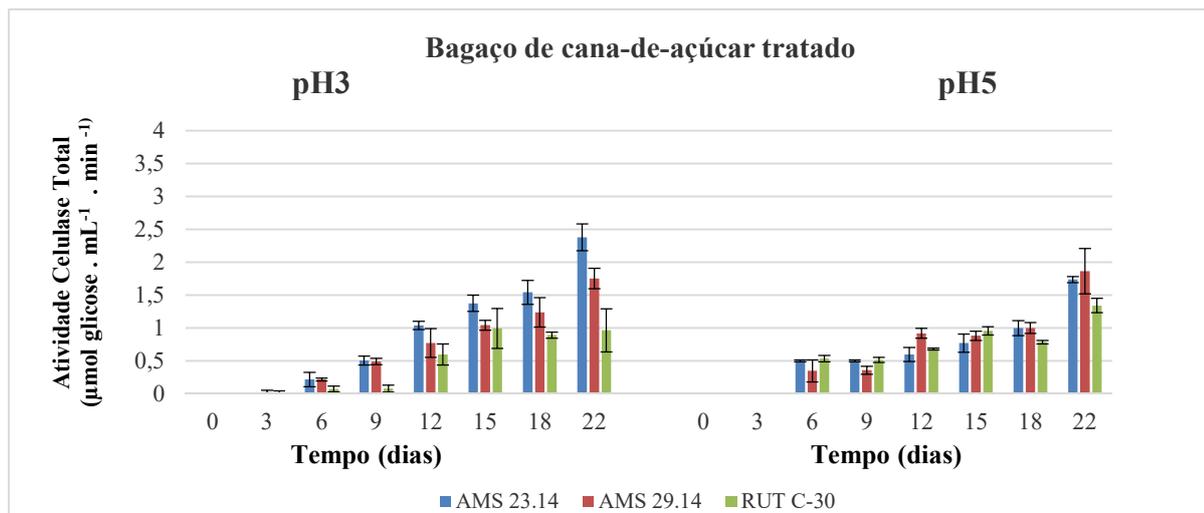


Figura 22. Atividade de celulase total (FPase), no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

Tabela 7. Atividade da celulase total ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
3 ^o	0,004 ^{1*}	0,026 ¹	0,016 ¹	0,000 ¹	0,018 ¹	0,000 ¹
6 ^o	0,214 ^{ijl}	0,215 ^{ijl}	0,084 ^{jl}	0,497 ^{ghijl}	0,346 ^{hijl}	0,532 ^{ghijl}
9 ^o	0,503 ^{ghijl}	0,488 ^{ghijl}	0,073 ^{jl}	0,497 ^{ghijl}	0,355 ^{hijl}	0,511 ^{ghijl}
12 ^o	1,036 ^{cdefg}	0,771 ^{efghi}	0,596 ^{ghijl}	0,594 ^{ghijl}	0,917 ^{defgh}	0,676 ^{fghij}
15 ^o	1,375 ^{bcde}	1,042 ^{cdefg}	0,993 ^{cdefg}	0,768 ^{efghi}	0,880 ^{defgh}	0,955 ^{cdefgh}
18 ^o	1,542 ^{bc}	1,239 ^{bcdef}	0,890 ^{defgh}	0,997 ^{cdefg}	1,000 ^{cdefg}	0,782 ^{efghi}
22 ^o	2,380 ^a	1,750 ^b	0,936 ^{cdefgh}	1,735 ^b	1,495 ^{bcd}	1,341 ^{bcde}

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Em um estudo realizado por Hargreaves (2008), com fungos filamentosos isolados de solos Amazônicos, ele obteve atividade de $0,30 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ com cinco dias de incubação em meio com pH 5, suplementado com bagaço de cana-de-açúcar tratado. No presente trabalho com seis dias de incubação no pH 5, as linhagens amazônicas *T. harzianum* AMS 23,14 e *T. harzianum* AMS 29.14 apresentaram atividade de $0,53 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,34 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente; valores superiores ao encontrado pelo autor. Alam et al. (2008), estudando a otimização da produção de celulase por *Trichoderma harzianum*, em meio líquido com lodo de esgoto doméstico, encontraram atividade máxima de $6,9 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $32,5 \text{ }^\circ\text{C}$ no pH 5,0. Já Silva et al. (2009) trabalhando com 1 % de resíduo de uva como substrato, observaram atividade de $0,11 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ por *Aspergillus phoenicis*, valores diferentes dos obtidos no presente trabalho.

Estes resultados mostram que os fatores como pH, tipos de substratos, temperatura e organismo podem influenciar na atividade enzimática, favorecendo, otimizando ou propiciando um resultado eficiente ou ineficiente (SALES et al., 2010). A água também pode ser um fator limitante e primordial, por possuir diversas funções em um bioprocessos. Em um cultivo de fungos filamentosos, por exemplo, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células ocasionando um desequilíbrio nas vias, o que afeta os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduz a taxa de crescimento microbiano e aumenta o período de aclimação celular (CASTRO, 2010). Em estudos levantados por Castro et al. (2010), eles apresentaram diferenças na características da produção enzimática em condições de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), evidenciando melhor desempenho e atividade na produção enzimática no estado submerso (FS), assim como, estabilidade das enzimas.

No tratamento suplementado com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, as linhagens amazônicas apresentaram atividade de celulase total superior ao padrão (*T. reesei* RUT C-30) em todos os períodos e pHs (3 e 5). O pH 3 proporcionou melhor atividade para as linhagens isoladas do solo amazônico, assim como o 22º dia de incubação (Figura 23). A linhagem *T. harzianum* AMS 29.14 apresentou $3,56 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou $2,75 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ de atividade, valores significativamente ($p < 0,05$) superiores ao do padrão *T. reesei* RUT C-30 ($1,63 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabela 8).

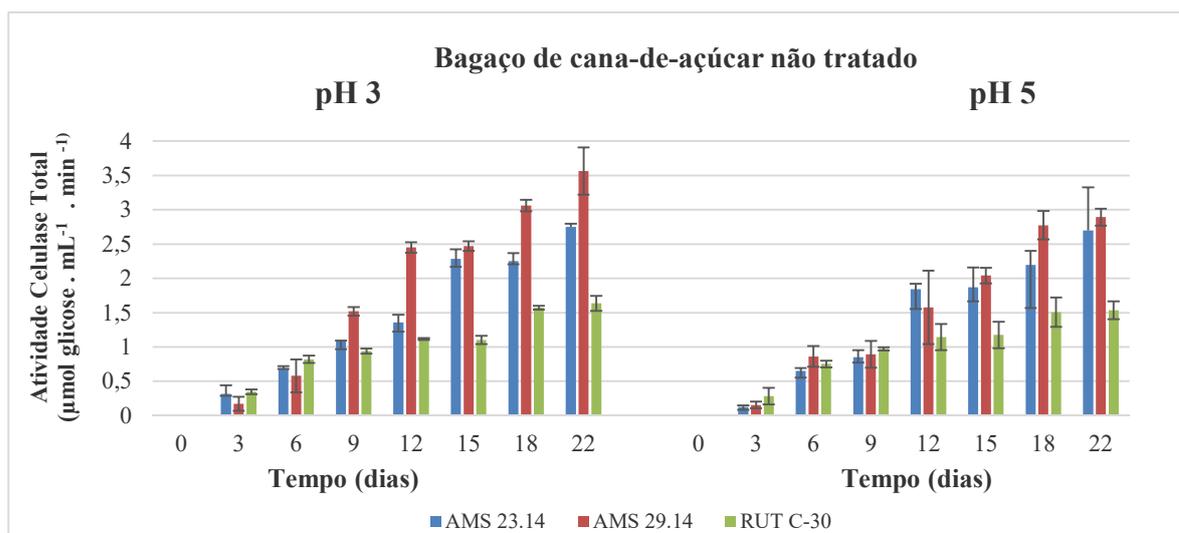


Figura 23. Atividade da celulase total (FPase) no meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

Tabela 8. Atividade da celulase total ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
3°	0,315 ^{mno}	0,171 ^{mno}	0,347 ^{mno}	0,124 ^o	0,154 ^{no}	0,282 ^{mno}
6°	0,691 ^{ilmno}	0,580 ^{lmno}	0,820 ^{ilmno}	0,653 ^{ilmno}	0,862 ^{hijlmno}	0,752 ^{ilmno}
9°	1,077 ^{ghijlmno}	1,520 ^{efghijl}	0,940 ^{hijlmno}	0,853 ^{ijlmno}	0,893 ^{hijlmno}	0,972 ^{hijlmno}
12°	1,361 ^{fghijl}	2,452 ^{bcde}	1,119 ^{ghilmno}	1,841 ^{defghi}	1,577 ^{efghijl}	1,146 ^{ghijlmn}
15°	2,286 ^{bcdef}	2,472 ^{bcde}	1,104 ^{ghilmno}	1,871 ^{defgh}	2,041 ^{cdefg}	1,176 ^{ghijlm}
18°	2,255 ^{bcde}	3,064 ^{ab}	1,573 ^{efghijl}	2,197 ^{bcdef}	2,776 ^{abcd}	1,508 ^{efghijl}
22°	2,753 ^{abcd}	3,568 ^{a*}	1,636 ^{efghij}	2,699 ^{abcd}	2,895 ^{abcd}	1,534 ^{efghijl}

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Silva (2014), ao analisar a atividade enzimática de fungos isolados do bioma amazônico, encontrou valor de atividade máxima de $0,303 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o fungo *Aspergillus ninger*, com 5 dias de incubação em bagaço de cana-de-açúcar não tratado. Este valor é similar ao observado no presente trabalho para as linhagens de *Trichoderma* com 3 dias de incubação e inferior ao 6° dia de incubação como observado na tabela 16.

De modo geral, foi observado que as linhagens isoladas de solos da Floresta Amazônica apresentaram atividade de celulase total (FPase) superior à linhagem padrão *T. reesei* RUT C-30 nos dois pHs estudados, principalmente no pH 3, em ambos os meios (tratado e não tratado), sendo o meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado o que apresentou valores de atividade superiores quando comparado com o tratado (Tabelas 7 e 8) Esses dados estão de acordo com as condições ambientais encontrados nos solos amazônicos (Tabela 2), na qual é demonstrada a predominância de acidez nesses solos (DEMATTE; DEMATTE, 1993; GON, 2004). Deste modo, é nítido que as linhagens Amazônicas apresentaram melhor desempenho de atividade celulolítica com as três enzimas (andoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) atuando de modo sinérgico. Atualmente, existe um apelo por busca de micro-organismos com elevada taxa de atividade enzimática, produzindo níveis apropriados das três enzimas capazes de degradar com eficácia a celulose natural (KUMAR; SINGH, SINGH, 2008; SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005)

5.4.2 Atividade de Endoglucanase

Para a atividade da endoglucanase em bagaço de cana-de-açúcar tratado, as linhagens isoladas do solo amazônico também apresentaram atividade superior as do padrão (*T. reesei*

RUT C-30), nas duas condições de pH's (3 e 5). Entretanto, o pH 3 foi observado melhor desempenho das linhagens quando comparado com o pH 5 (Figura 24 e Tabela 9).

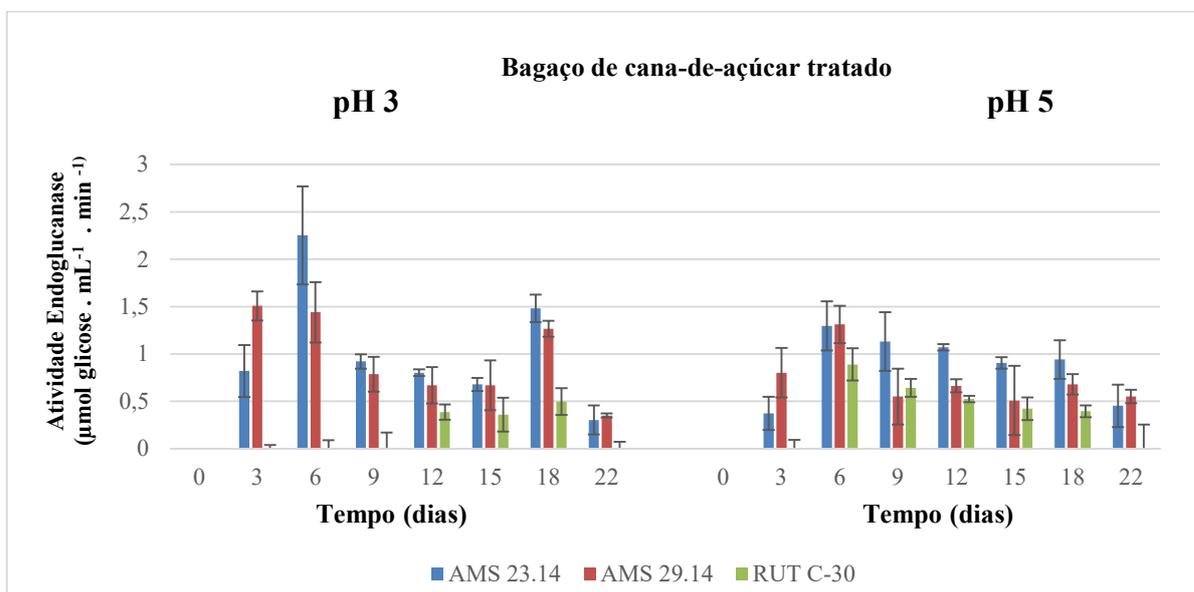


Figura 24. Atividade da endoglucanase (CMCase) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono nos pH.

Tabela 9. Atividade da endoglucanase (CMCase) ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
6°	2,252 a*	1,440 b	0,000 f	1,297 bc	1,311 bc	0,890 bcde
9°	0,920 bcde	0,787 bcde	0,070 f	0,900 bcde	0,550 def	0,643 cdef
12°	0,802 bcde	0,669 cdef	0,386 def	1,070 bcd	0,663 cdef	0,525 def
15°	0,679 cdef	0,669 cdef	0,360 def	0,905 bcde	0,509 def	0,422 def
18°	1,481 b	1,265 bc	0,499 def	0,941 bcde	0,679 bcde	0,396 def
22°	0,304 ef	0,350 ef	0,000 f	0,453 def	0,550 def	0,000 f

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

A melhor atividade foi observada no 6° dia no pH 3, onde a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou $2,52 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e a linhagem *T. harzianum* AMS 29.14 apresentou $1,44 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de atividade. Esses valores foram significativamente diferentes da linhagem padrão que não apresentou atividade neste período, iniciando sua atividade de endoglucanase no 12° dia no pH 3 com $0,070 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Figura 24).

Em um trabalho similar realizado por Khan et al. (2007), com linhagens de *Trichoderma harzianum*, eles observaram atividade de $1,88 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de endoglucanase no 4° dia de incubação em bagaço de cana-de-açúcar tratado. Esse valor foi inferior ao encontrado para a

linhagem da Amazônia, *T. harzianum* AMS 23.14 em pH 3, a qual exibiu atividade de 2,25 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ com 6 dias de incubação. O autor Mendoza (2009) também trabalhando com *Trichoderma harzianum*, em meio líquido com bagaço de cana-de-açúcar tratado utilizando 1% (m/v), obteve atividade da endoglucanase de 0,032 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ após 9 dias de cultivo, valor inferior ao observado no presente trabalho. Esses resultados mostram que a mesma espécie pode possuir alto ou baixo potencial de atividade enzimática, sugerindo assim, que o ambiente do qual obteve-se o micro-organismo possa ter influência em suas características.

Em relação ao experimento com bagaço de cana-de-açúcar não tratado as linhagens amazônicas continuaram apresentando atividade superior ao padrão (*T. reesei* RUT C-30) utilizado no presente trabalho (Figura 25).

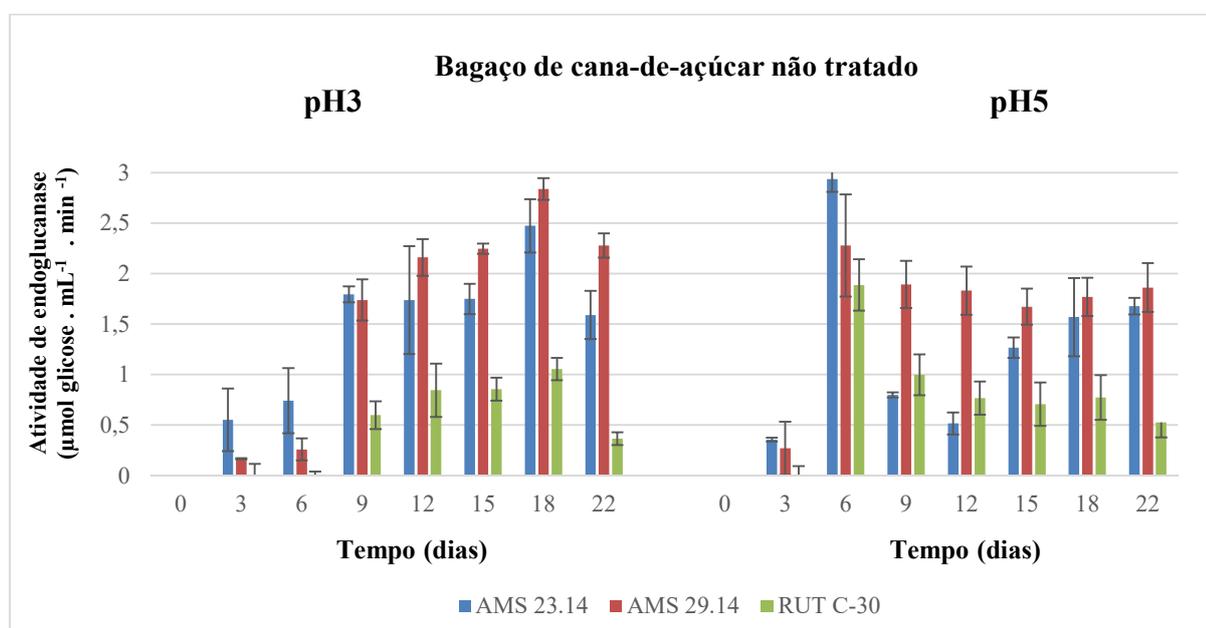


Figura 25. Atividade da endoglucanase (CMCase) no meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

O pH 3 continuou proporcionando melhor desempenho de atividade para as linhagens isoladas do solo amazônico no decorrer de todo período. Entretanto, o 6º dia no pH 5 apresentou um pico de atividade superior quando comparado com o 6º dia no pH 3. Evidenciando atividade de 2,93 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ para a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 no pH 5 e 2,27 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ para a linhagem *T. harzianum* AMS 29.14, valores significativamente ($p < 0,05$) superiores ao do padrão (*T. reesei* RUT C-30), que obteve 1,88 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ (Tabela 10).

Tabela 10. Atividade da endoglucanase (CMCase) ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
3°	0,418 ^{jlmn}	0,178 ^{lmn}	0,000 ⁿ	0,356 ^{jlmn}	0,268 ^{jlmn}	0,000 ⁿ
6°	0,741 ^{hijlmn}	0,257 ^{jlmn}	0,029 ^{mn}	2,936 ^a	2,278 ^{abc}	1,887 ^{bcd}
9°	1,794 ^{bcde}	1,738 ^{bcde}	0,597 ^{ijlmn}	0,797 ^{ghijlmn}	1,892 ^{bcd}	0,998 ^{efghijl}
12°	1,738 ^{bcde}	2,159 ^{abc}	0,843 ^{fghijlmn}	0,514 ^{ijlmn}	1,830 ^{bcde}	0,766 ^{ghijlmn}
15°	1,748 ^{bcde}	2,247 ^{abc}	0,854 ^{fghijlm}	1,265 ^{defghi}	1,671 ^{bcdef}	0,705 ^{ijlmn}
18°	2,473 ^{ab}	2,838 ^{a*}	1,054 ^{defghij}	1,568 ^{cdefgh}	1,769 ^{bcde}	0,771 ^{ghijlmn}
22°	1,589 ^{cdefg}	2,278 ^{abc}	0,365 ^{jlmn}	1,676 ^{bcdef}	1,861 ^{bcd}	0,525 ^{ijlmn}

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Essa alta atividade observada se repetiu no pH 3, entretanto, ocorreu no período de 18 dias, em que a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou $2,47 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e a linhagem *T. harzianum* 29.14, $2,83 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Mostrando que no pH 5 a melhor incidência de atividade foi apenas no período do 6° dia, havendo um decaimento na atividade nos dias seguintes. Diferente do pH 3, onde a atividade se manteve alta a partir do 9° dia de incubação até o 18° dia, sendo o período de melhor atividade.

Gerhardt (2015) em seu trabalho com linhagens de *Trichoderma* spp., isoladas de solos amazônicos, obteve atividade de endoglucanase de $0,37 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ com 5 dias de incubação em pH 5 com bagaço de cana-de-açúcar não tratado. Esse valor foi inferior ao observado no presente trabalho quando comparado com 6 dias de incubação para as linhagens Amazônicas em ambos os pHs.

No entanto, Silva (2014) em ensaios contendo bagaço de cana-de-açúcar não tratado em pH 5 obteve atividade de endoglucanase de $4,7 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ com 5 dias de incubação em seu trabalho com fungos filamentosos isolados de solos da Amazônia. Esse valor é superior ao encontrado para a linhagem *T. harzianum* AMS 29.14 ($2,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}$). Contudo, é válido citar que a concentração de substrato utilizado no trabalho da autora foi de 9,5 % e superior ao utilizado no presente trabalho (1%). Já foi demonstrado que a atividade celulolítica é influenciada pela concentração de substrato (ALAM et al., 2008; SALES et al., 2010), podendo justificar a atividade inferior nesse trabalho, assim como, sugerir que, aumentando a concentração de substrato disponível pode se aumentar a atividade celulolítica dos isolados.

Similarmente aos dados obtidos na análise atividade de celulase total, o pH 3 apresentou características que favorecem a atividade enzimática de endoglucanase para linhagens amazônicas, quando comparada com o pH 5, assim como o meio com bagaço de cana não

tratado, estimulou uma maior atividade enzimática (Figuras 24 e 25). A alta atividade enzimática observada quando o substrato aplicado foi o bagaço não tratado, sugere que as linhagens Amazônicas foram eficientes na degradação do bagaço natural. Sugerindo que o ambiente amazônico possa ter influenciado, devido a rápida e eficiente ciclagem do material vegetal disponível de forma abundante neste ambiente, entretanto mais estudos são necessários para tal confirmação.

5.4.3 Atividade da Exoglucanase

Quando avaliada a atividade de exoglucanase, observou-se que o pH 3 proporcionou melhor atividade para as linhagens amazônicas, e que as mesmas obtiveram atividade superior ao do padrão (*T. reesei* RUT C-30) (Figura 26). A linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou atividade de $0,14 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ enquanto que a linhagem *T. harzianum* 29.14 apresentou $0,15 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, valores que embora superiores ao do padrão *T. reesei* RUT C-30 ($0,11 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), não foram significativamente diferentes (Tabela 11).

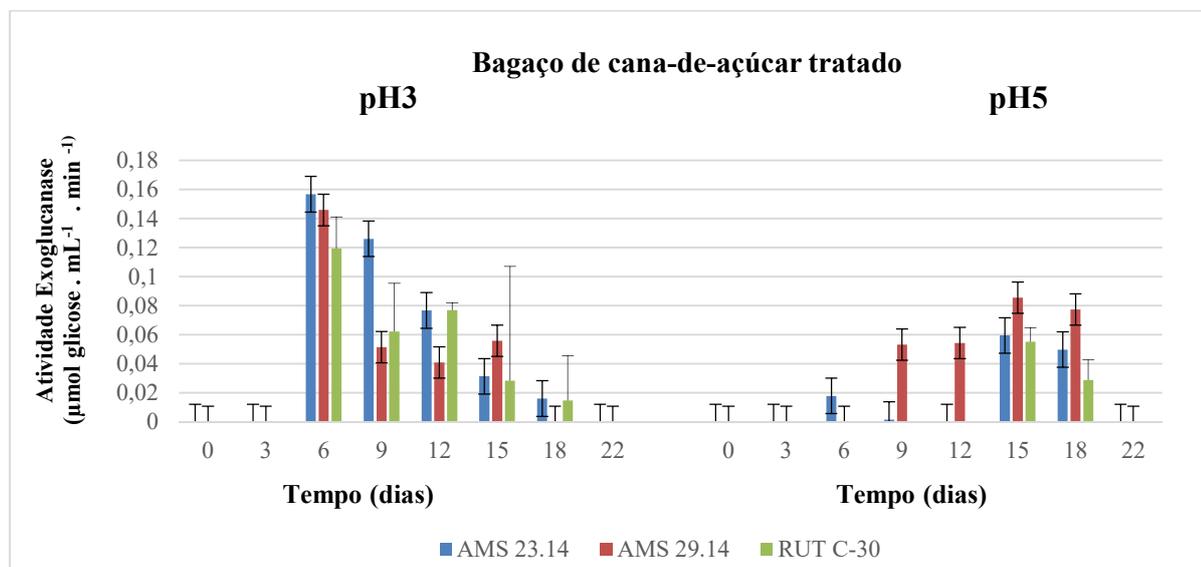


Figura 26. Atividade da exoglucanase (Avicelase) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

Tabela 11. Atividade da exoglucanase (Avicelase) ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
6 ^o	0,156 ^{a*}	0,145 ^{ab}	0,119 ^{abc}	0,025 ^{bc}	0,015 ^c	0,003 ^c
9 ^o	0,126 ^{abc}	0,051 ^{abc}	0,062 ^{abc}	0,022 ^{bc}	0,053 ^{abc}	0,009 ^c
12 ^o	0,076 ^{abc}	0,040 ^{abc}	0,077 ^{abc}	0,012 ^c	0,058 ^{abc}	0,004 ^c
15 ^o	0,031 ^{abc}	0,056 ^{abc}	0,46 ^{abc}	0,059 ^{abc}	0,085 ^{abc}	0,055 ^{abc}
18 ^o	0,026 ^{bc}	0,003 ^c	0,023 ^{bc}	0,049 ^{abc}	0,077 ^{abc}	0,028 ^{bc}

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

A enzima exoglucanase é pouco reportada na literatura, entretanto possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. Embora a IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) defina essa enzima como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica em oligossacarídeos e celobiose, há relatos do ataque de terminais redutores por essa enzima (CASTRO, 2010).

Em relação à atividade da enzima exoglucanase no experimento suplementado com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, é notável que o fator pH influenciou no desempenho de atividade enzimática. Sendo o pH 3 o que proporciona melhor atividade para as linhagens (Figura 27 e Tabela 12).

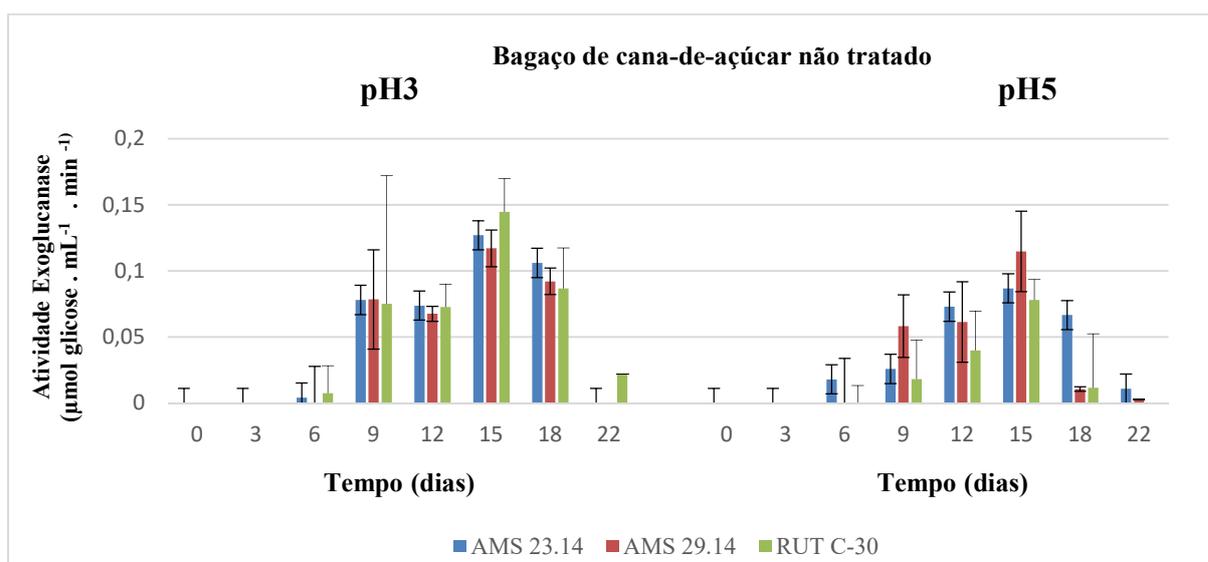


Figura 27. Atividade da exoglucanase (Avicelase) no meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

Tabela 12. Atividade da exoglucanase (Avicelase) ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
6°	0,171 ^a	0,090 ^a	0,148 ^a	0,045 ^a	0,000 ^a	0,003 ^a
9°	0,078 ^a	0,07 ^a	0,135 ^a	0,025 ^a	0,058 ^a	0,025 ^a
12°	0,073 ^a	0,06 ^a	0,072 ^a	0,075 ^a	0,061 ^a	0,039 ^a
15°	0,073 ^a	0,11 ^a	0,144 ^a	0,086 ^a	0,114 ^a	0,078 ^a
18°	0,11 ^a	0,09 ^a	0,086 ^a	0,070 ^a	0,010 ^a	0,026 ^a

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Ainda em relação ao pH 3, a linhagem padrão *T. reesei* RUT C-30 apresentou atividade similar as linhagens amazônicas, sendo o período de 15 dias o de maior pico de atividade, com $0,11 \mu\text{l.mL}^{-1}$ para *T. harzianum* AMS 23.14, $0,12 \mu\text{l.mL}^{-1}$ para *T. harzianum* AMS 29.14 e $0,14 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para o padrão *T. reesei* RUT C-30. Entretanto, no meio de cultivo no pH 5, as linhagens amazônicas apresentaram atividade superior ao padrão em todos os períodos (Figura 26). No 15° dia, ocorreu o maior desempenho de atividade, onde a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou $0,08 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e a AMS 29.14 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ apresentou $0,11 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de atividade. Estes dados, apesar de superior ao do padrão ($0,07 \mu\text{mol.mL}^{-1}$), não foram significativamente diferentes. Os resultados obtidos para a linhagem padrão e a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14, foram similares aos obtidos por Gerhardt et al. (2015), onde os autores trabalhando com linhagens de *Trichoderma* spp. isoladas de solo amazônico, obtiveram valor de *T. harzianum* AMS $0,07 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ com cinco dias de incubação em bagaço de cana não tratado. Em outro estudo, os autores Sales et al. (2010), também apresentaram resultados parecidos à esse trabalho, avaliando o fungo *Aspergillus aculeatus*, a mais alta atividade de exoglucanase obtida foi de $0,17 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ no pH 6,0, concentração de substrato 1,5% e temperatura de cultivo a 40°C . Entretanto, é válido ressaltar que a concentração de substrato do presente trabalho foi inferior ao dos autores em referência. Estes resultados mostram que as linhagens de *Trichoderma* isoladas no presente trabalho apresentaram valores de atividade similar com uma concentração menor de substrato.

De modo geral, o tipo de substrato não demonstrou diferença para os três isolados, assim como o pH 3. No pH 5 houve uma melhor atividade para os isolados amazônicos quando comparados com o padrão (*T. reesei* RUT C-30), entretanto não foram significativamente diferentes.

5.4.4 Atividade da β -glicosidase

Em relação à atividade da β -glicosidase, em meio de cultivo suplementado com bagaço de cana-de-açúcar tratado, foi observado atividade significativamente superior para as linhagens isoladas dos solos amazônicos em todos os períodos estudados e ambos pH's (3 e 5), quando comparadas com a linhagem padrão *T. reesei* RUT C-30 (Figura 28 e Tabela 13).

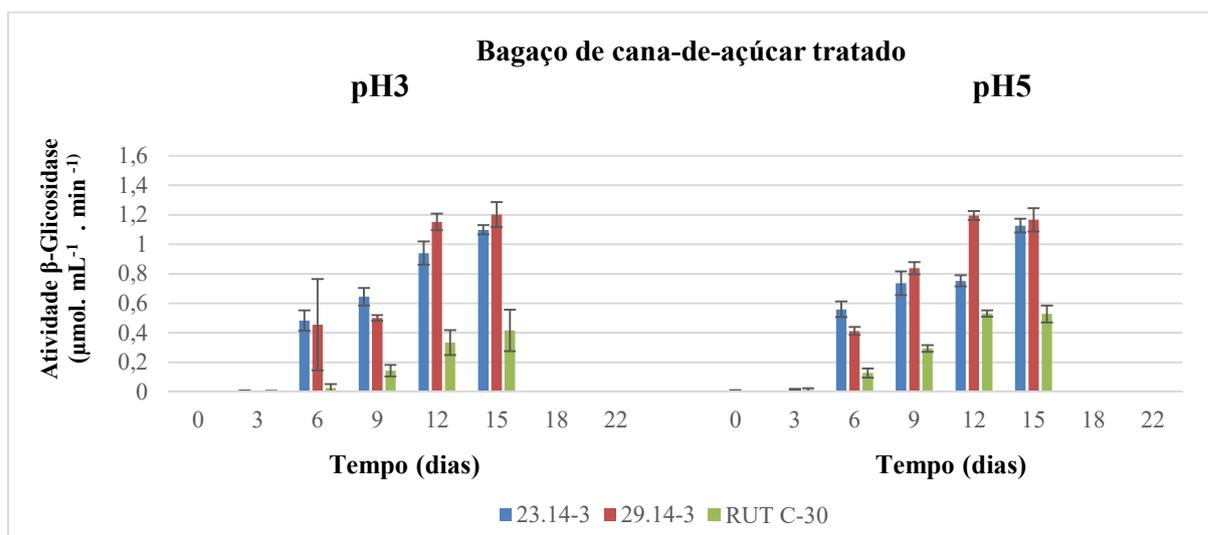


Figura 28. Atividade da β -glicosidase no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

Tabela 13. Atividade da β -glicosidase ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
6°	0,933 ^{fghi}	0,088 ^{fghi}	0,052 ^m	1,083 ^{efg}	0,797 ^{ghi}	0,245 ^{lm}
9°	1,247 ^{def}	0,967 ^{fgh}	0,267 ^{ilm}	1,424 ^{de}	1,620 ^{cd}	0,568 ^{ijl}
12°	1,820 ^{bc}	2,229 ^{a*}	0,646 ^{hij}	2,252 ^a	2,313 ^a	1,025 ^{fg}
15°	2,125 ^{ab}	2,325 ^a	0,803 ^{ghi}	2,180 ^{ab}	2,256 ^a	1,020 ^{fg}

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

O pH 3 proporcionou melhor atividade para ambas as linhagens (*T. harzianum* AMS 23.14 e *T. harzianum* AMS 29.14). No 15° dia, *T. harzianum* AMS 29.14 apresentou atividade de $1,20 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ e a linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 apresentou $1,09 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, valores significativamente ($p < 0,05$) superiores ao da linhagem padrão *T. reesei* RUT C-30) que apresentou $0,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Em estudo realizado com o padrão *Trichoderma reesei*, Sternberg (1976) obteve o valor máximo de atividade de β -glicosidase de $0,3 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, com aproximadamente 4 dias de incubação, próximos aos obtidos no presente trabalho para a linhagem padrão (*T. reesei* RUT

C-30). Segundo Singhanian et al. 2010, a linhagem padrão *T. reesei* é conhecida por produzir baixa quantidade da enzima β -glicosidase. Este resultado, pode-se dar devido às condições ácidas que se desenvolvem no meio durante o período de máxima produção de celulase (MANDEL, 1975) inibindo sua atividade. Entretanto, tais resultados não foram observados no presente trabalho para as linhagens isoladas de solos da Floresta Amazônica. Sugerindo que devido a adaptabilidade do ambiente amazônico, as linhagens desenvolveram potencial de degradação em condições mais ácidas de pH.

Em estudos realizados com fungo *Asperillum ninger* pelos autores Aguiar et al., (2000), foi observado que as linhagens deste gênero produziram atividade de β -glicosidase de $0,8 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ com bagaço de cana-de-açúcar tratado, valores inferiores ao do presente trabalho com as linhagens de *Trichoderma*. Já os autores Martins et al. (2008), estudando a produção de β -glicosidase pelo fungo *Penicillium echinulatum*, através de fermentação submersa em meio contendo farelo de trigo por 8 dias, obtiveram atividade de $0,31 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, valores inferiores aos observados no presente trabalho com 6 dias de incubação para as linhagens amazônicas.

Em relação ao experimento com bagaço de cana-de-açúcar não tratado as linhagens amazônicas apresentaram atividade significativamente superiores ao padrão em todos os períodos e ambos pH's (3 e 5) (Figura 29). O período de 15 dias de incubação, apresentou melhor atividade para ambas as linhagens amazônicas no pH3. A linhagem *T. harzianum* AMS 23.14 e *T. harzianum* AMS 29.14 apresentaram atividade de $1,20 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, diferente do valor máximo de atividade do padrão, que foi de $0,44 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ (Tabela 14).

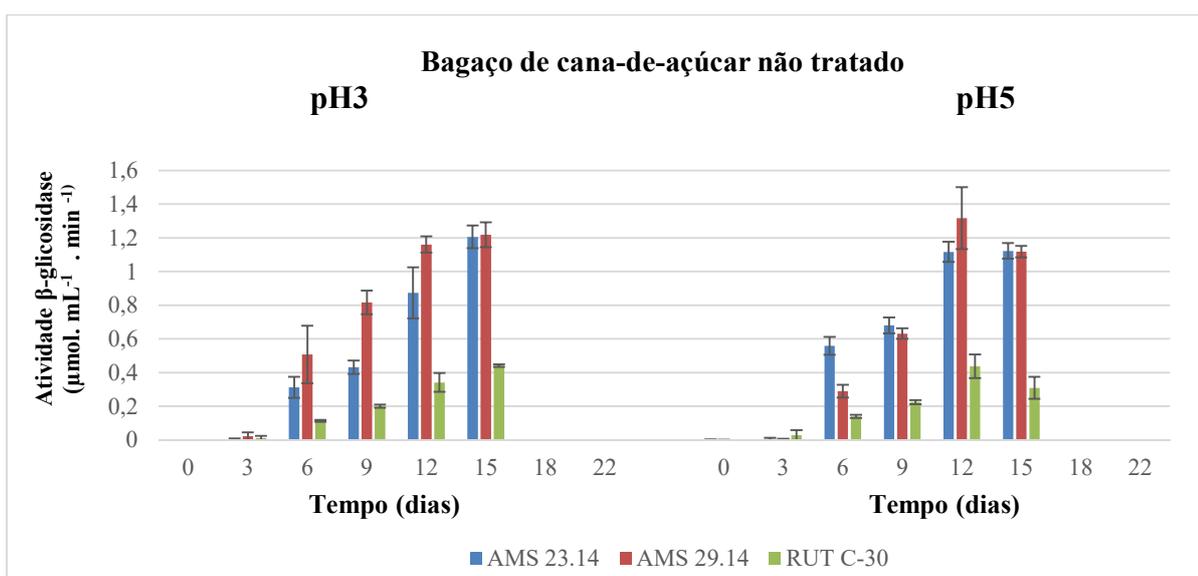


Figura 29. Atividade da β -glicosidase no meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono em diferentes pH.

Tabela 14. Atividade da β -glicosidase ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$) no meio com bagaço de cana-de-açúcar não tratado como substrato e única fonte de carbono sob diferentes pH.

Tempo (dias)	pH 3			pH 5		
	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30	AMS 23.14	AMS 29.14	RUT C-30
6º	0,604 ^{ghij}	0,983 ^{efghi}	0,333 ^j	1,083 ^{defgh}	0,560 ^{hij}	0,270 ^j
9º	1,165 ^{defgh}	1,580 ^{cde}	0,388 ^{ij}	1,317 ^{defgh}	1,222 ^{defg}	0,434 ^{ij}
12º	1,691 ^{bcd}	2,246 ^{ab}	0,661 ^{ghij}	2,161 ^{abc}	2,549 ^a	0,848 ^{fghij}
15º	2,333 ^{a*}	2,335 ^a	0,854 ^{fghij}	2,172 ^{abc}	2,164 ^{abc}	0,598 ^{ghij}

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Gerhardt et al. (2015), obtiveram atividade de β -glicosidase de $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ com a linhagem de *Trichoderma* spp, isolados de solos amazônicos do estado do Mato Grosso. Esse resultado foi obtido em um ensaio conduzido com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, com 5 dias de incubação em pH 5. Esse valor está próximo ao encontrado no presente trabalho com 6 dias de incubação (Figura 29). Valores bastante inferiores ($0,006 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) foram descritos por Silvia (2014), em um trabalho conduzido com fungos filamentosos isolados de solos amazônicos empregando *Penicillium* após 5 dias de incubação.

A enzima β -glicosidase é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise (CASTRO, 2010), e em ambos os tratamentos (bagaço tratado e não tratado; pH 3 e 5) foi observado que não houve atividade pela enzima no 18º e 22º dia, sugerindo que devido a produtividade gerada tenha inibido sua atividade.

De maneira geral, as linhagens amazônicas se destacam quanto à atividade enzimática de β -glicosidase demonstrando serem promissoras para exploração biotecnológica. O pH e os tratamentos com bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado não apresentaram diferenças significativas entre as linhagens Amazônicas para a atividade da enzima β -glicosidase, muito embora, detectou-se uma melhor atividade para linhagem *T. harzianum* AMS 29.14. Estes resultados mostram a versatilidade das linhagens de produzirem enzimas celulolíticas em diferentes condições.

5.4.5 Considerações gerais sobre as linhagens amazônicas e o potencial celulolítico

A partir do desempenho notado para as linhagens Amazônicas no pH 3 e com substrato bagaço de cana-de-açúcar não tratado, a figura 30, apresenta os resultados de atividade para endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e celulase total, dos isolados amazônicos (*T. harzianum* AMS 23.14 e *T. harzianum* AMS 23.140) e do padrão utilizado *T. reesei* RUT C-30.

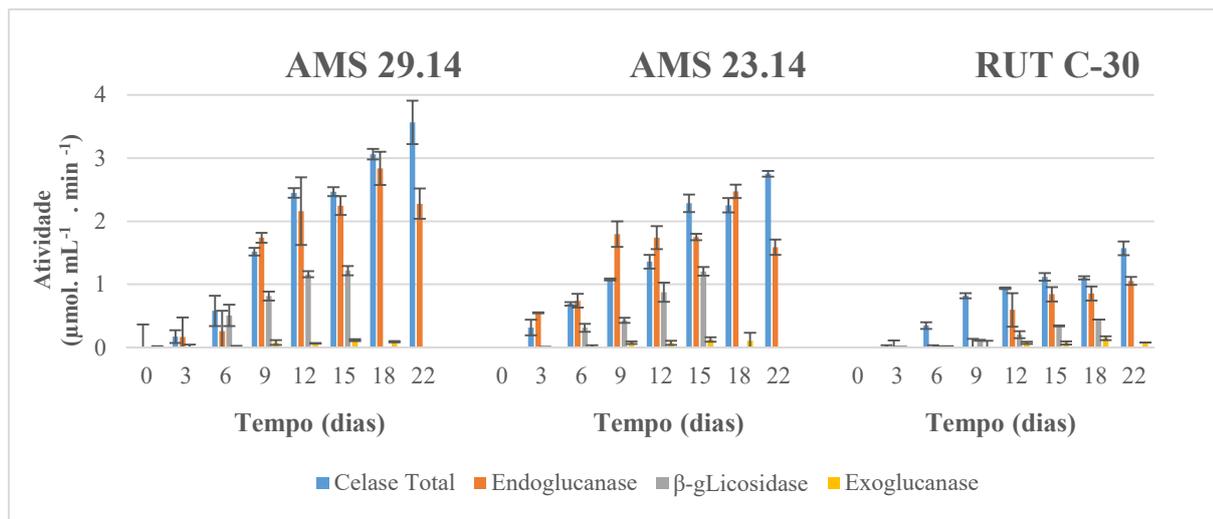


Figura 30. Atividade enzimática celulolítica das linhagens Amazônicas (*T. harzianum* AMS 29.14 e *T. harzianum* AMS 23.14) e do padrão *T. reesei* RUT C-30, no tratamento pH 3 com bagaço de cana-de-açúcar não tratado.

Quando comparada a atividade das linhagens Amazônicas com o padrão *T. reesei* RUT C-30, é notório que as linhagens amazônicas apresentaram atividade superior ao padrão *T. reesei* RUT C-30 para todas as enzimas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) e em todo o período de dias avaliado.

Os autores Osvaldo et al. (2011), estudando o potencial celulolítico de fungos filamentosos do Bioma Caatinga, observaram melhor atividade em meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar não tratado, quando comparado com o tratado, assim como no presente trabalho. Dessa forma, sugere-se que não é necessário submeter o bagaço de cana-de-açúcar a tratamento ácido ou alcalino para facilitar o ataque das enzimas celulolíticas à celulose por estas linhagens Amazônicas, evitando assim, problemas como corrosão de equipamentos e alta demanda de energia utilizada para a recuperação do ácido (geralmente, H_2SO_4 ou HCl) utilizado no processo de tratamento, assim como, correção do pH do material celulósico obtido através do tratamento (GÓMEZ, 1985; PARAJO, 1998; GALBE; ZACCHI, 2002; SAHA, 2003; TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Foi evidente perceber que as enzimas endoglucanase e β -glicosidase apresentaram atividade superior a enzima exoglucanase em todos os períodos de incubação. A baixa atividade observada para a enzima exoglucanase pode ser resultado da inibição da celobiose, ou seja, do seu produto de hidrólise (ZHANG e LYND, 2004) resultando, assim, em baixa atividade quando comparada com as demais enzimas.

Similarmente, a atividade da celulase total, que trata-se da ação das três enzimas agindo simultaneamente na degradação do substrato, é observado maior atividade quando comparado cada enzima separadamente. Na literatura já é reportado que quando essas enzimas atuam

conjuntamente, há um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (CASTRO, 2010).

Quando comparado à atividade das linhagens amazônicas, o isolado *T. harzianum* AMS 29.14 apresentou atividade superior ao *T. harzianum* AMS 23.14. *T. harzianum* AMS 29.14 trata-se de uma linhagem obtida do ponto AMS12, um local que apresentou as maiores taxas de matéria orgânica, nitrogênio e argila. Além de que, esta área corresponde ao local próximo ao curso d'água e, portanto, habitat de alta umidade. Enzimas extracelulares como as do complexo celulolítico (endoglucanase, exoglicanase e β -glicosidase) são enzimas responsáveis por ação hidrolítica (BASSO, 2011), ou seja, ocorre na presença de água, sugerindo, assim, que os fatores do ambiente amazônico, do qual a linhagem foi isolada deve influenciar no seu desempenho funcional.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo proporcionaram evidências de que os solos da Floresta Amazônica possuem grande diversidade de *Trichoderma* com alto potencial celulolítico. Duas linhagens isoladas e selecionadas (*T. harzianum* AMS 23.14 e *T. harzianum* AMS 29.14) destacaram-se por demonstrar atividade superior ao padrão utilizado, o isolado hiper-celulolítico *T. reesei* RUT C-30, com uso de bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pH 3.

A partir destes resultados é notório que as linhagens isoladas desse bioma possuem grande potencial de atividade celulolítica, e que estudos mais aprofundados podem proporcionar o futuro emprego desses fungos em diversas áreas industriais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v.18, p.57-70, 2000.
- AGUIAR FILHO, José M. M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado).
- AHMAD, J. S.; BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.77, p. 182-189, 1987.
- ALAM, M. Z.; MUYIBI, S. A.; WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4709–4716, 2008.
- DEMATTE, J. L. I.; DEMATTE, J. A. M. Comparações entre as propriedades químicas de solos das regiões da floresta amazônica e do cerrado do Brasil Central. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 2, p. 272–286, 1993.
- GON, D. Dinâmica da matéria orgânica na recuperação de clareiras da floresta amazônica. n. 1, p. 1013–1019, 2004.
- HARGREAVES, P. I. Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. p. 75f, 2008.
- HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.
- KUBICEK, C. P. et al. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: A case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 3, p. 310–319, 2003.
- LI, Y. et al. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 503–510, 2016.
- MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.
- SADFI-ZOUAOUI, N. et al. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. **Canadian journal**

of microbiology, v. 55, p. 154–162, 2009.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290–1296, 2010.

ZHANG, C. L. et al. *Trichoderma* biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 251–257, 2005.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1990.

AMIN, F.; RAZDAN, V.K.; F. A. MOHIDDIN, F.A.; BHAT, K.A.; SHEIKH, P.A. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in vitro*. **Journal of Phytology, Humnabad**, v. 2, n. 10, p. 34–37, 2010.

AOCDE-FAO. Disponível em: < <http://www.agri-outlook.org/>> Acessado em 27 de Janeiro de 2017.

ATTILI, D.S. Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1994.

AWAFO, V.A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acucar e madeira em decomposição. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v.45, p.1282-1289, 2010

BAILEY, B. A. & LUMSDEN, R. D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Enzymes, biological control and commercial applications**. v. 2, p. 185-204. 1998.

BÉGUIN, P.; AUBERT J. The biological degradation cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**. v.13, n. 1, p 25-58, 1994.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. *Trichoderma* in Brazil: history, research, commercialization and perspectives. **IOBC-WPRS**, v.15, p.49. 2008.

BIJAYALAXMI DEVI, N. & YADAVA, P.S. Seasonal dynamics in soil microbial biomass C, N and P in a mixed-oak forest ecosystem of Manipur, North-east India. **Appl. Soil Ecol.**, v.31, n.10, p.220-227, 2006.

BISSETT, J., SZAKACS G., NOLAN C. A. DRUZHININA I., GRADINGER C., KUNICEK C. P., (2003) New species of *Trichoderma* from Asia. **Canadian Journal of Botany.**, v. 81, p.570-586, 2003.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. 1ª ed. Rio de Janeiro. **Interciência Brasil.** p. 241-271, 2008.

BORTOLLAZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo- Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). **Microbiological Research**, v. 157, p. 115-125, 2002.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**. v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARBONE, I., KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia.**, v. 91, p. 553-556, 1999.

CASTELLANI, A. A brief note on the viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water and a simple method to maintain fungal strains in mycological collections, preventing pleomorphism. **Impr. Méd.**, v. 24, p. 270-272, 1960.

CASTRO, A.M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2006. Tese de Mestrado. Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CENCIANI, K.; LAMBAIS, M. R.; CERRI, C. C.; de AZEVEDO, L. C. B.; FEIGL, B. J. Bacteria diversity and microbial biomass in forest pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Rev. Bras. Ciênc. Solo** [online], vol.33, n.4, p. 907-916, 2009.

CHAVERRI, P., SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. **Stud Mycol.** v. 48, p.1-116, 2003.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L.. Directed Evolution of Industrial Enzymes: an Update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, n. 4, p. 438-443, 2003.

CHRISTENSEN, M. Soil microfungi of dry to mesic conifer-hardwood forests in northern Wisconsin. **Ecology**, v. 50, p. 9–27, 1969.

CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2004.

COSTON, M.B. & LOOMIS JR, W.F. (1969) Isozymes of β -glucosidase in *Dictyostelium discoideum*. **Journal Bacteriology**, v.100, p. 1208-1217.

DA SILVA, R; YIM, D.K; PARK, Y.K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, Oxford, v.77, p. 109-111, 1994.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. **Soil Biol. Biochem.** v. 5, p. 495-504, 1973.

DEMATTÊ, J.L.I. Manejo de solos ácidos dos trópicos úmidos – Região Amazônica. Campinas: **Fundação Cargill**, p. 215, 1988

DEMATTÊ, J. L. I.; DEMATTÊ, J. A. M. Comparações entre as propriedades químicas de solos das regiões da floresta amazônica e do cerrado do Brasil Central. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 2, p. 272–286, 1993.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**. v. 20, p. 11-21, 2004.

DINAKARAN, J.; KRISHNAYYA, N.S.R. Variations in soil organic carbon and litter decomposition across different tropical vegetal covers. **Current Science**, v. 99, n. 8, p. 1051-1060.

DE BELLIS, T.; KERNAGHAN, G.; WIDDEN, P. Plant community influences on soil microfungi assemblages in boreal mixed-wood forests. **Mycologia**, v. 99, p. 356–367, 2007.

DOMSH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**, London: Academic Press. v. 1, 1980.

DRUZHININA I., KUBICEK C. P., (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**. v.2, p. 100-112. 2005.

DRUZHININA I.S., SEIDL-SEIBOTH V., HERRERA-ESTRELLA A., HORWITZ B.A., KENERLEY C.M., et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 9, p.749-59, 2011.

EDWARDS, A P. & BREMER, J.M. Microaggregates in soil. **J. Soil Sci.**, v. 18, p. 64-73, 1967.

ELAD, Y., CHET, I., HENNIS, Y. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. **Phytoparasitica**, v.9, p.59-67, 1981.

EL-GOGARY, S.; LEITE, A.; CRIVELLARO, O.; EVELEIGH, DE; EL-DORRY, H: Mechanism by which cellulose triggers Cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 86, p. 6138-6141, 1989.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred: II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL. M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred: I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FARINAS, C. S., A Parede Celular Vegetal e As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação. **Embrapa Instrumentação**. São Carlos, SP. 2011.

FEARNSIDE, P.M. Desmatamento na Amazônia Brasileira: história, índices e conseqüências. **Megadiversidade**, v. 1, p. 113- 123, 2005.

FLORENCIO, C. Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. **São Carlos: UFSCar**, p. 83, 2011.

FORTES, F. O. et al. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.

FORZZA, R.C., LEITMAN, P.M., COSTA, A., DE CARVALHO JR., A.A., PEIXOTO, A.L., WALTER, B.M.T., BICUDO, C., ZAPPI, D, DA COSTA, D.P., et al. 2010. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.618-628, 2002.

GERHARDT, J. A. CARVALHO I. F., SILVA M. L., POLIZELI, M. L. T. M., ANOLCH, R. C., Avaliação da atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região norte do estado de mato grosso. **Enciclopédia Biosfera**, v. 64, n. 9, p. 11–12, 2015.

GHERBAWY, Y., DRUZHININA, I., SHABAN G. M., WUCSKOSKY, M., YASER, M., EI-NAGHY, M. A. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile Valley, Egypt consist of only two species. **Mycol. Prog**. v. 3, p. 211-218, 2004.

GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**., v.55, n.4, p. 295- 334, 1995.

GOLUEKE, C.G. Compost as a micro- nutrient supplier. In: The staff of Biocycle Journal of Waste Recycling (Eds) - Principles of Composting. Emmaus, Pennsylvania, **The JG Press, Inc.**, p.161-162, 1991

GÓMEZ, R.J.H.C. Sacarificação de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. UNICAMP, 1985.

GON, D. Dinâmica da matéria orgânica na recuperação de clareiras da floresta amazônica. **Pesq. agropec. bras.**, v. 1, p. 1013–1019, 2004.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol: Current Opinion in Chemical Biology. v. 10, p. 141-146, 2006.

HACKL, E.; ZECHMEISTER, S. B. ; BODROSSY, L.; SESSITSCH, A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 5057–65, 2004.

HAMADA, N. & J. W. MCCREADIE. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. **Hydrobiologia**, v.39, p.71–78, 1999.

HARGREAVES, P. I. Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. 2008. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

HARMAN, G.E.; Petzoldt, R.; Comis, A. e Chen, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, v. 94, n. 2: p. 146-153, 2004

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.96, p.190-194, 2006.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-32, 2001.

HERMOSA, M.R., KECK, E.J., CHAMORRO, I., RUBIO, M.B., SANZ, L., VIZCAI'NO, J.A. Genetic variability shown by a collection of biocontrol isolates of *Trichoderma*. **Mycol. Res.** v.108, p. 897–906, 2004.

HIBBETT, D.S., OHMAN, A., GLOTZER, D., NUHN, M., KIRK, P., NILSSON, H.R., Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biol.** v. 25, p. 9, 2011.

HIMMEL, M.E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, p. 358-364, 1999.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSET, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.51, p.409-416, 2009.

HYDE, K.D. & ALIAS, S.A. Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing *Nypa fruticans*. **Biodiversity and Conservation** v. 9, p. 393-402, 2000.

JAKLITSCH, W.M., SAMUELS, G.J., DODD, S.L., LU, B.S., AND DRUZHININA, I.S. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. **Stud. Mycol.** v. 56, p. 135–177, 2006.

JUNIOR, O. L. F. et al. Atividade de enzimas ligninocelulolíticas envolvidas na degradação do bagaço de cana-de-açúcar por linhagens fúngicas. **Embrapa Meio Ambiente - Repositório Alice**, p. 1–8, 2011.

JURANDY, E.; NOGUEIRA, B.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo.**, v. 2, p 221, 2016.

KHAN, M. H., ALI, S., FAKHRU’L-RAZI, A., ALAM, Z., Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme, **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.42, n.4, p.381-386, 2007.

KERSHAW, M.J.; MOORHOUSE, E.R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S.E.; CHARNLEY, A.K. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 74, n. 3, p. 213- 223. 1999.

KIM, C. S., SHIROUZU, T., NAKAGIRI, A., SOTOME, K., NAGASAWA, E., MAEKAWA, N. *Trichoderma mienum* sp. nov., isolated from mushroom farms in Japan. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.102, n.4, p.629–641. 2012.

KIM, C. S.; SHIROUZU, T.; NAKAGIRI, A. *Trichoderma eijii* and *T. pseudolacteum* , two new species from Japan. p. 739–753, 2013.

KRUGER, T.L. E BACCHI, L.M.A. - Fungos. In: Filho, A.B.; Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M., Camargo, L.E.A. - **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, Agronômica Ceres, 3 ed., p. 46–95, 1995

KRUUS, K., WANG, W.K., CHING, J., WU, J.K. (1995) Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, major cellulosome componente. **Journal of Microbiology**. v. 177 p. 6, 1641, 1995.

KUBICEK, C. P. et al. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: A case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 3, p. 310–319, 2003.

KUMAR, R., SINGH, S., SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol** v. 35, p.377–391, 2008.

LANGE, L., BECH, L., BUSK, P.K., GRELL, M.N., HUANG, Y., LANGE, M., LINDE, T., PILGAARD, B., ROTH, D., TONG, X.. The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. **IMA Fungus**, v.3, p.87–92, 2012.

LEPSCH, I.F. Influência do cultivo de *Eucalyptus* e *Pinus* nas propriedades químicas de solos sob cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.4, p. 103-107, 1980

LEPSCH, I.F. 19 Lições de Pedologia. **Oficina do texto**, p. 456, 2011

LIMAYEN, A. and RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospect. **Prog. Energy. Comb. Sci.** v. 38, p. 449-467, 2012

LOPES, V.R.; JUNIOR, G.F.; BRAGA, R.; JESUS, M.A. de; MARTINS, C.; PINTO, G. Atividade da Xilanase em Cepas de *Colletotrichum* e *Trichoderma*. **SINAFERM**, Natal, RN, 2009.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A.; STRAATSMA, G.; FRANCO-MOLANO, A. E. *et al.* Macrofungal diversity in Colombian Amazon forest varies with regions and with regimes of disturbance. **Biodivers.Conserv.** v. 21, p. 2221-2243, 2012.

LÓPEZ-QUINTERO, C. A. *et al.* DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 657–674, 2013.

LORITO, M.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. **Annual Review Phytopathology** Palo Alto, v. 498, p. 395–417, 2010.

LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol.Mol.Biol.Rev.**, v.66, p. 506-577, 2002.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Thichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.

MARQUES, M.F.O.; BARBOSA, F.R.; GUSMÃO, L.F.P.; CASTAÑEDA-RUIZ, R.F. & MAIA, L.C. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga Biome of Brazil. *Cubasina microspora* sp. nov., a note on *C. albofusca*, and some new records for South America. **Mycotaxon** v. 102 p. 17-23, 2007

- MANFIO, G. P. Microbiota. In: **Microorganismo.**, v.2, p. 113-25, 2003.
- MANDELS, M., WEBER, J., PARIZEK, R., 1971. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. **Appl. Microbiol.** v. 21, p 152–154, 1971.
- MANDELS, M., D. STEMNBERG, AND R. E. ANDREOTTI. Growth and cellulase production by *Trichoderma*. Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose. The Finnish National Fund for Research and Development, **In M. Bailey, T-M. Enari, and M. Linko (ed.)**, Helsinki. p. 231-254 1975.
- MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, p. 414-415, 1985.
- MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1417-1427, 2008.
- MATOS, A.T.; FONTES, M.P.F.; JORDÃO, C.P.; COSTA, L.M. Mobilidade e formas de retenção de metais pesados em Adsorção de cobre em solos 489 latossolo vermelho-amarelo. **Rev. Brasil. Ciênc. Solo**, v. 20, p.379-386, 1996.
- MENDOZA, D.P.G. Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Univerdidade de Brasília, Brasília, 2009.
- MENEZES, T.J.B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, São Paulo, v.31, n.2, p.116-120, 1997.
- MENEZES, J. P. Fungos em Bibliotecas: Frequência dos gêneros em livros e elaboração de teste para avaliação da biorreceptividade em papéis. 2009, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426428, 1959.
- Ministério do Meio Ambiente. Bioma Amazônia. Disponível em: <
<http://www.mma.gov.br/biomas/amaz%C3%B4nia>> Acessado em 31 de Janeiro de 2017.
- MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* gainst *Fusarium oxysporum*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 181-91, 2006.
- MONTENECOURT, B.S., EVELEIGH, D.E. Selective screening for the isolation of high yielding cellulase mutants of *T. reesei*. **Adv. Chem. Ser.**, v.181, p.289-301, 1979.
- MOREIRA, N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. **Scientific News online**, v. 168, p. 209-224, 2005.

MOURA, JOSÉ M. S.; PELEJA, J. R. P.; FARIA, D. S. Estudos Integrativos da Amazônia. **Universidade Federal do Oeste do Pará**, 2011.

MUMMEY, D.L.; CLARKE, J.T.; COLE, C.A.; O'CONNOR, B.G.; GANNON, J.E.; RAMSEY, P.W. Spatial analysis reveals differences in soil microbial community interactions between adjacent coniferous forest and clearcut ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 42, p. 1138-1147, 2010.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Page, A.L., et al. (Eds.), **Methods of Soil Analysis**., v. 9, p. 539–581, 1982.

NOGUEIRA, E.B.S. & CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ H.; DOMINGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**. v. 66 p. 25-40, 1998.

PARK, M. S., OH, S. Y., CHO, H. J., FONG, J. J., CHEON, W., LIM, Y. W. *Trichoderma songyi* sp. nov., a new species associated with the pine mushroom (*Tricholoma matsutake*). **Antonie van Leeuwenhoek**. v.106, p.593–603. 2014

PARUNGAO, M.M.; FRYAR, S.C. & HYDE, K.D. Diversity of fungi on rain forest litter in North Queensland, **Australia. Biodiversity and Conservation** v. 11, p. 1185-1194, 2002

PETROVA, S.D.; BAKALOVA, N.G.; KOLEV, D.N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**. v. 24, p. 2104-2111, 2002.

PHILIPPIDIS, G.P.; SMITH, T.K.; WYMAN, C.E. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering, New York**, v. 41, p. 846–853, 1993.

POLISHOOK, J.D.; BILLS, G.F. & LODGE, D.J. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. **Journal of Industrial Microbiology** v.17, p. 284-294, 1996.

RAVEN, P.H. **Our diminishing tropical forest**. In: E.O. Wilson (ed.). NationalAcademy Press, Washington DC, USA, v.30, p. 119-112, 1988.

REESE E.T., MANDELS M. Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulases. **Annu. Rep. Ferm. Proc.** V.7, p.1–20, 1984.

REINO, J. L., GUERRERO, R. F., HERNANDEZ-GALAN, R., COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry**, v.7, p. 89–123, 2008

ROCHA, C.P. Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.205-211, 2004.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SADFI-ZOUAOUI, N. et al. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, p. 154–162, 2009.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 30, p. 279–291, 2003.

SAID, S., PIETRO, R.C.L.R., Enzimas como agentes biotecnológicos. 1ª. Ed.. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, p. 416, 2004.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1290–1296, 2010.

SAMUEL, N., HADAVI, N. *Trichoderma*: review of biology and systematics of the genus. **Journal of General Microbiology**, v.100, p. 923-35, 1996.

SAMUELS, G. J., DODD, S. L., GAMS, W., CASTLEBURY, L. A., PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, p.146–170, 2002.

SANCHEZ, P.A. Properties and management of soils in the tropics. **New York, John Wiley**, p. 618, 1976.

SANTORO, D. C., ASSIS, T., DIONISIO, S. R., IENCZAK, J. L., RABELO, S. C., Scaling up dilute sulfuric acid pretreatment for sugarcane bagasse bioethanol production. Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 2015.

SHELLER, H.V. AND ULVSKOR, P. Hemicellulose. **Rev. Plant. Biol**, v. 61, p. 263-89, 2010.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v, 87, p. 787-799, 2010.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum*. **Phytopathology**, v. 95, p. 76-84, 2005.

SILVA, A. DA S. E. Avaliação da produção de celulasas e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da Amazônia. 2014. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas.

SILVA, R., STEINDORFF, A. S., ULHOA, C. J., FELIX, R. C. Involvement of Galpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (Hypocrea jecorina) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. **Biotechnol Lett.** V. 31, p. 531–536, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K. Improved Cellulase Production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF Through Process Optimization. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.12 p. 60–70, 2007.

SINGHANIA R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 10, p 90-100, 2010.

SIPOS, B. Conversion of lignocelluloses to fermentable sugars production for ethanol. Budapest: Department of Applied Biotechnology and Food Science, Budapest University of Technology and Economics, 2010. p. 201 (PhD Thesis)

STERNBERG, D.B. Glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role is sacharification of cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.31, p.648-654, 1976.

SUBRAMANIAN, C. V. Tropical mycology: future needs and development. **Current Science**, v.51, p. 321-325, 1982.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renew Energy.** v. 34, p. 421-424, 2009.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources.** v. 2, p. 472-499, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAKENAKA, A., COLIN G.D., KUDO, H., IBASH I., CHENG, K. Molecular cloning, expression and characterization of an endo- β 1,4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*. **Journal Microbiol** v.45, p. 57-61, 1999.

TEN, L.N.; IM, W.T.; KIM, M.K.; KANG, M.S.; LEE, S.T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**. v.56, p.375-382, 2004.

TOLAN, J. S.; FOODY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, 1999

VAN BEILEN, J.; LI, Z. Enzyme Technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca: **NewYork: Cornell University Press**, v. 2, p. 476, 1994.

VASQUEZ, M. P. Desenvolvimento de Processo de Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultânea para a Produção de Etanol a partir de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2007

VALENCIA, E.Y., CHAMBERGO, F.S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genet. Biol.**v. 60 9–18, 2013.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T.C. Amazônia: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: **Ceres**, p. 416, 2010.

VIDAURRE, Q. et al. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.109, p. 633–651,2016.

VILELA, E, D, S.; Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2013.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. v. 96, p. 491–499, 2005.

WERTZ, A. T.; RONDA, J. M.; CZEISLER, C. A.; WRIGHT, K. P. Effects of sleep inertia on cognition. **JAMA**, v. 295, p.163–164, 2006.

WIDDEN, P.; ABITBOL, J. J. Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce- forest soil. **Mycologia**, v. 72, p.775-84, 1980.

WILSON, D.B. Aerobic microbial cellulase systems. In: **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. p. 374-392, 2008.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology Bioenergy**, v. 88, p. 797-824, 2004.

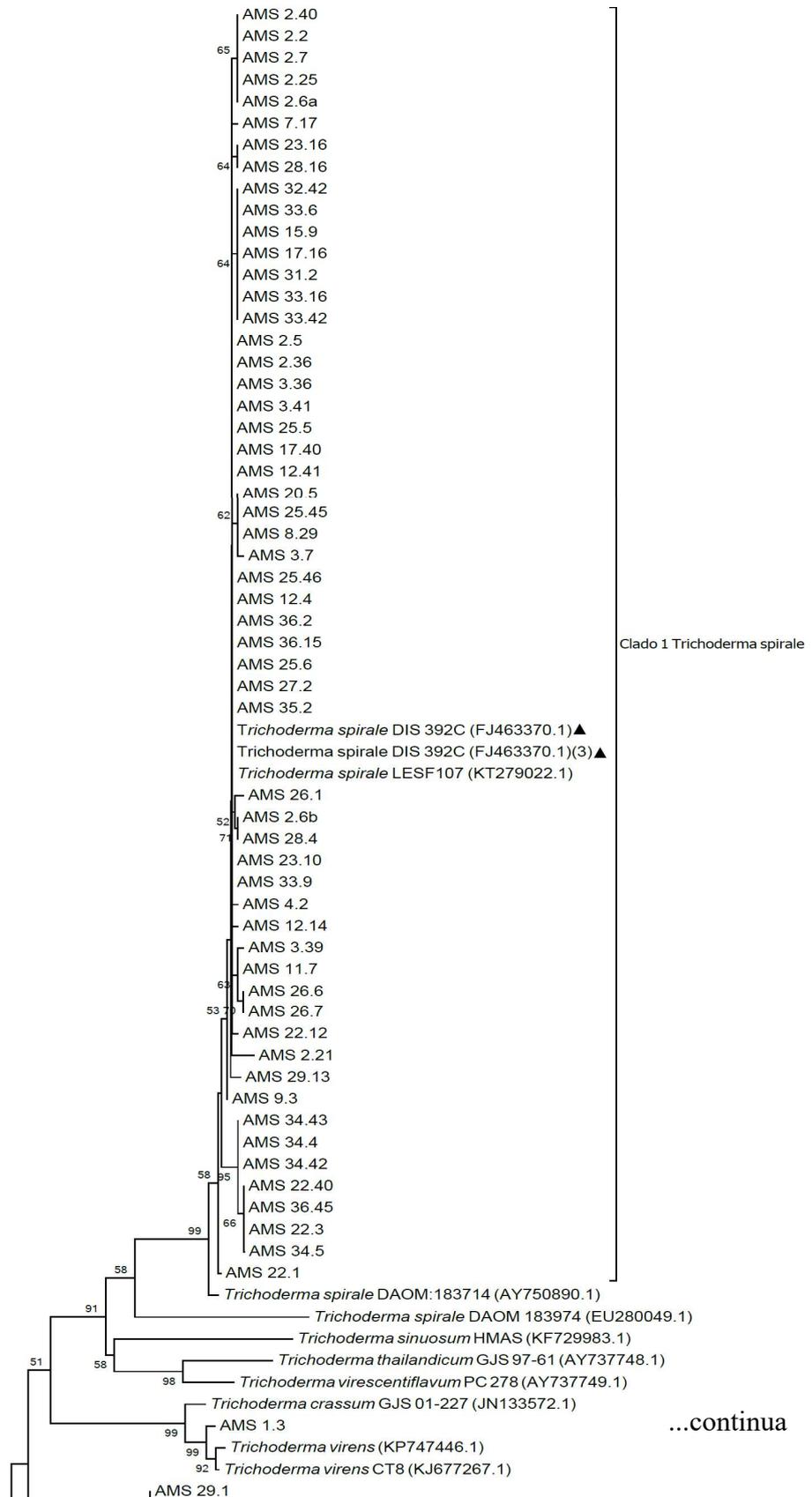
ZHANG, C. L. et al. Trichoderma biodiversity in China: Evidence for a North to South distribution of species in East Asia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 251–257, 2005.

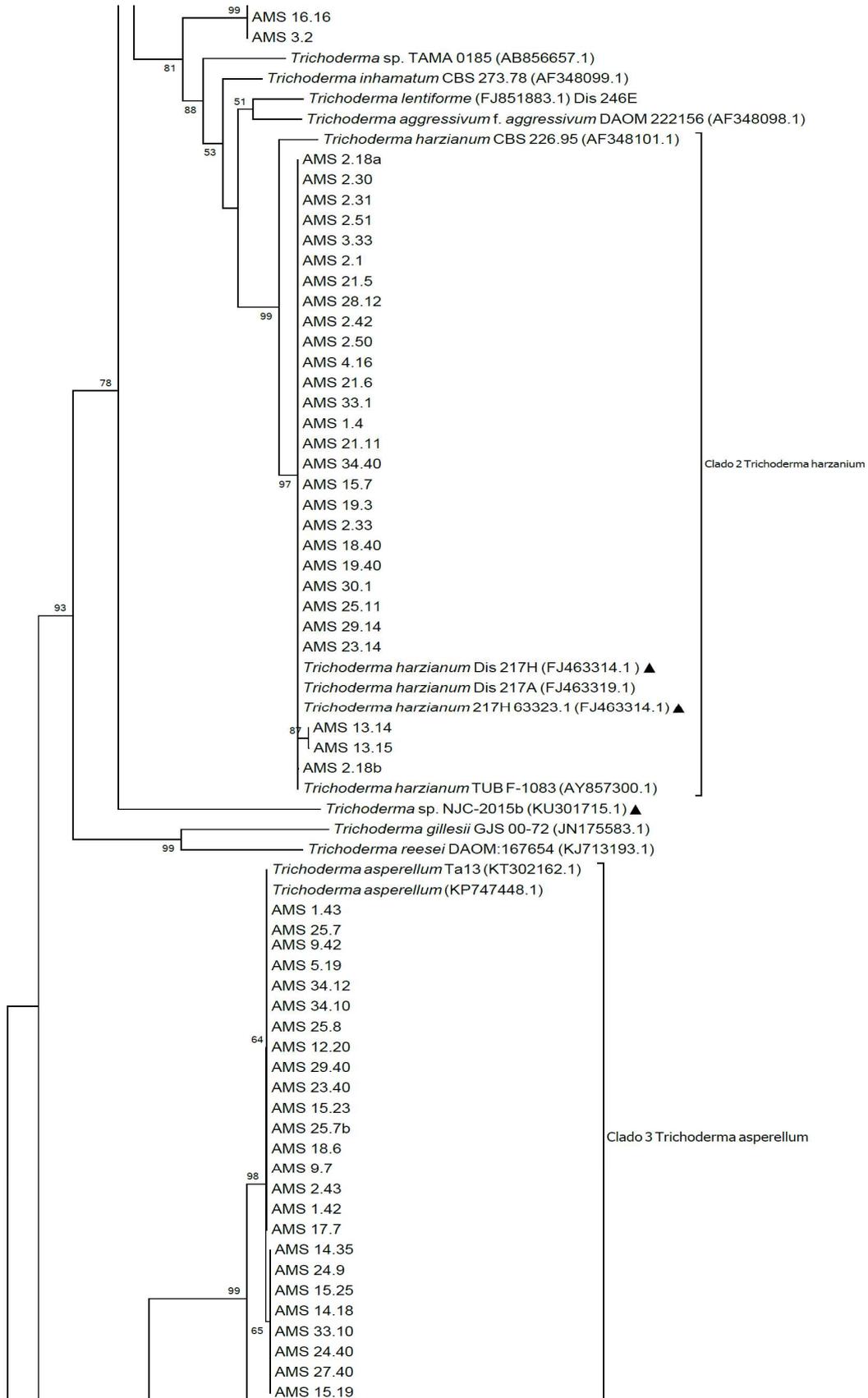
ZHANG, Y.-H.P., HIMMEL, M.E., MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol. Adv.** v. 24, p. 452–481, 2006

ZHU, Z. X., ZHUANG, W. Y. Three new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from China. **Mycologia**, v.8, p. 80-92, 2015.

ANEXOS

Árvore gerada pelos iniciadores EF1 e TEFr da região de elongação alfa-1 com todos os isolados obtidos do solos amazônicos.





...continua

