

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**ESTUDO DA MICROBIOTA EDÁFICA DA ÁREA CÁRSTICA DE
SÃO DESIDÉRIO-BA E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL
CELULOLÍTICO PARA POSSÍVEIS APLICAÇÕES EM
MICROBIOLOGIA AMBIENTAL.**

CAIO CÉSAR PIRES DE PAULA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ecologia e Recursos
Naturais da Universidade Federal de São
Carlos, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirna Helena Regali Seleglim

SÃO CARLOS

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P324em

Paula, Caio César Pires de.

Estudo da microbiota edáfica da área cárstica de São Desidério-BA e avaliação do seu potencial celulolítico para possíveis aplicações em microbiologia ambiental / Caio César Pires de Paula. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 108 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Microbiologia. 2. Fungos filamentosos. 3. Catão, Gruta do (São Desidério, BA). 4. Biomassa microbiana. 5. Celulase. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

Caio Cesar Pires de Paula


Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2014


BANCA EXAMINADORA

Presidente 

Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleghim
(Orientadora)

1º Examinador 

Profa. Dra. Maria Elina Bichuette
PPGERN/UFSCar

2º Examinador 

Profa. Dra. Cristiane Sanches Farinas
EMBRAPA/São Carlos-SP

Dedico este trabalho à minha mãe,
Maria Celeste, pelo exemplo de pessoa
que sempre me inspirou, ao meu pai
Simal, e meus irmãos, Leonardo e Ana
Laura, pelo amor, apoio, confiança e
amizade.

*“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o
que você faz com aquilo que você sabe.”*

Aldous Huxley

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Celeste, meu pai, Simal e meus dois irmãos, Leonardo e Ana Laura que me apoiaram nessa trajetória;

À Prof^a. Dr^a. Mirna Helena Regali Seleglim pelas suas orientações e colaborações ao meu projeto, e pela sua contribuição na minha formação ética e profissional;

Ao Dr André Rodrigues pela oportunidade em conhecer mais sobre taxonomia morfológica e molecular de fungos;

À Dr^a Cristiane Sanchez Farinas pela oportunidade em conhecer e realizar as fermentações na Embrapa Instrumentação São Carlos;

À Prof^a Dr^a Maria Elina Bichuette (FAPESP 2010/08459-4) que tanto ajudou a compreender melhor o ambiente subterrâneo e me incentivou nos trabalhos acadêmicos, além de colaborar ativamente na discussão do trabalho;

Ao Prof Dr Igor Polikarpov do Instituto de Física de São Carlos (USP) pela oportunidade em conhecer metodologias para análises enzimáticas desenvolvidas em seu laboratório;

A equipe do Laboratório de Estudos Subterrâneos (Camile Fernandes, Jonas Gallão, Luiza Simões, Diego Monteiro e Emilio Manoel Calvo) que contribuíram com este estudo, ao coletarem os fungos na caverna do Catão;

À técnica do grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos, Maria Luíza Voltatódio, pelos seus ensinamentos referentes às análises enzimáticas;

À doutoranda Camila Florencio por ter me auxiliado durante os experimentos realizados na Embrapa Instrumentação São Carlos;

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela oportunidade de complementar a minha formação profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro dado ao projeto;

Ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade pela licença de coleta concedida (licença ICMBio/SISBIO 10215);

Ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar por toda a infra-estrutura oferecida;

À técnica do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos Darci da Consolação Diniz Javaroti por todos os seus ensinamentos que me permitiu evoluir como microbiologista;

Ao técnico José Valdecir de Lucca pela sua colaboração nas análises químicas;

Aos amigos biólogos conquistados durante toda a formação de mestrando;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho ou que fizeram parte da minha vida neste período.

RESUMO

Os ambientes cavernícolas são oligotróficos e possuem características específicas que determinam a microbiota local. Poucos estudos têm investigado a composição e funcionalidade da microbiota edáfica de ambientes subterrâneos. Este trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a microbiota cavernícola, discutir o papel funcional da microbiota nesses ambientes, isolar e selecionar linhagens fúngicas com potencial biotecnológico para a degradação de celulose. Foram coletadas amostras de solo do meio epígeo e de dois pontos no interior da caverna do Catão, São Desidério-BA. Nas amostras foram avaliadas as quantidades de carbono orgânico total, a densidade microbiana, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, bem como isoladas linhagens de fungos filamentosos. Todas as linhagens foram avaliadas quanto as atividades de endoglucanase, celulase total e β -glucosidases por meio de fermentação submersa. Dessas linhagens foram selecionadas três linhagens de *Aspergillus*, sendo uma linhagem padrão, e uma linhagem de *Penicillium* para o processo de fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato. Observamos uma diferença significativa entre o meio epígeo e subterrâneo em relação aos parâmetros físicos, químicos e biológicos do solo avaliados. Obtivemos 20 isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (SDC1.1, SDC 1.2, SDC 1.4, SDC 1.6, SDC 2.4, SDC 2.6, SDC 2.8, SDC 2.10, SDC 2.11, SDC 2.12), *Penicillium* (SDC 1.3, SDC 1.7, SDC 2.2, SDC 2.7, SDC2.9, SDC 2.13), *Trichoderma* (SDC 2.3), *Scopulariopsis* (SDC 2.1) e *Purpureocillium* (SDC 2.5). De todos os isolados 90% apresentaram atividade celulolítica. Durante a fermentação submersa a atividade endoglucanase apresentou valores máximos de 6,39 IU/mL em uma linhagem de *Aspergillus* sp6 e a atividade máxima de celulase total foi de 1,7 IU/mL para uma linhagem *Aspergillus* sp8. A linhagem *Aspergillus* sp6 apresentou atividade β -glucosidase máxima de 13,67 IU/mL. Em relação a fermentação em estado sólido, as linhagens *Aspergillus* sp6 e *Aspergillus* sp8 se destacaram em relação a linhagem padrão *Aspergillus niger* 3T5B8, com valores de atividade endoglucanase e celulase total superiores e com um menor conteúdo proteico em seus extratos enzimáticos. A partir desses resultados, concluímos que o ambiente cavernícola apresenta singularidades em relação ao meio epígeo e que provavelmente permite selecionar naturalmente microrganismos que utilizam fontes alternativas para obtenção de energia e nutrientes.

Palavras-chave: fungos, gruta do Catão, biomassa microbiana, celulase.

ABSTRACT

The cave environments are oligotrophic and have specific characteristics that determine the native microbiota. Few studies have investigated the composition and function of soil microbiota of subterranean environments. This study aimed to expand the knowledge on the cave microbiota, discuss the functional role of the microbiota in these environments, isolate and select fungal strains with biotechnological potential for the degradation of cellulose. Soil epigeal environment and two points inside the cave Catão, São Desiderio – BA, were sampled. The amount of total organic carbon, carbon and nitrogen in the microbial biomass and the microbial density was evaluated in the soil. All strains were evaluated for the activities of endoglucanase, β -glucosidase and total cellulase by submerged fermentation. Of these three strains of *Aspergillus* strains, one strain standard, and a *Penicillium* the process of solid state fermentation using wheat bran as substrate were selected. We observed a significant difference between epigeal and subterranean environment in relation to physical, chemical and biological soil parameters evaluated. We obtained 20 isolates belonging of the genus *Aspergillus* (SDC1.1, SDC 1.2, SDC 1.4, SDC 1.6, SDC 2.4, SDC 2.6, SDC 2.8, SDC 2.10, SDC 2.11, SDC 2.12), *Penicillium* (SDC 1.3, SDC 1.7, SDC 2.2, SDC 2.7, SDC2.9, SDC 2.13), *Trichoderma* (SDC 2.3), *Scopulariopsis* (SDC 2.1) e *Purpureocillium* (SDC 2.5). Of all isolates showed 90% cellulolytic activity. During the submerged fermentation endoglucanase activity showed maximum values of 6.39 IU/mL in a strain of *Aspergillus* sp6 and maximum total cellulase activity was 1.7 IU/ml for *Aspergillus* sp8 strain. The strain *Aspergillus* sp6 showed maximum β -glucosidase activity of 13.67 IU/mL. Compared to solid-state fermentation, the *Aspergillus* sp6 and *Aspergillus* sp8 strains stood out compared to mutant strain *Aspergillus niger* 3T5B8, with values of endoglucanase and total cellulase activity higher whole with a lower protein content in their enzymatic extracts. From these resultados, we conclude that the cave environment presents singularities compared to epigeal environment which probably allows you to select naturally microorganisms that use alternative sources for energy and nutrients.

Key words: fungi, cave Catão, microbial biomass, cellulase.

Sumário	
I Introdução	13
II Revisão Bibliográfica	16
II.1 Ambientes subterrâneos	16
II.2 Microrganismos no subterrâneo	21
II.3 Biomassa vegetal	26
II.4 Microrganismos celulolíticos	31
II.5 Aplicação das celulasas	36
II.6 Processos Fermentativos	39
II.7 Resíduos Lignocelulósicos	43
III Justificativa	46
IV Hipótese	46
V Objetivos	47
V.1 Objetivos específicos	47
VI. Materiais e Métodos	48
VI.1 Área de estudo	48
VI.2 Coleta	52
VI.3 Isolamento e caracterização das linhagens	53
VI.4 Parâmetros químicos e biológicos do solo	54
a) Carbono orgânico total	54
b) Biomassa microbiana	55
c) Densidade microbiana	56
VI.5 Seleção de fungos produtores de enzimas celulolíticas	56
VI.6 Produção de enzimas celulolíticas	57
VI.7 Determinação do teor proteico	57

VI.8	Quantificação das atividades enzimáticas	58
VI.9	Fermentação em estado sólido	59
VI.10	Análise estatística	61
VII	Resultados e discussão	62
VII.1	Parâmetros químicos e biológicos do solo	62
VII.2	Isolamento e caracterização das linhagens	70
VII.3	Seleção de fungos celulolíticos	73
VII.4	Fermentação submersa	75
VII.5	Fermentação em estado sólido	87
VII.6	Considerações finais	94
VIII.	Conclusão	96
IX.	Referências Bibliográficas	98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Divisão de uma caverna em zonas distintas, classificadas de acordo com a incidência de luz..... 17
- Figura 2.** Mapa do Brasil destacando todas as áreas cársticas no país e as cavernas catalogadas até dezembro de 2011 junto ao CECAV 20
- Figura 3.** Distribuição de 225 estudos micológicos em cavernas ou minas. Cada localidade foi categorizada em: sem estudos (no data), 1 estudo, 2-3 estudos, 4-8 estudos, ou ≥ 9 estudos..... 25
- Figura 4.** Monossacarídeos constituintes da hemicelulose: D-glucose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), 4-O-metil-D-glucorônico (6), E-L-ramnose (7)..... 27
- Figura 5.** Estrutura hipotética de lignina. 27
- Figura 6.** Estrutura esquemática de uma fibrila de celulose, destacando as regiões amorfas e cristalinas..... 28
- Figura 7.** Representação esquemática das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas. Em destaque a molécula de celulose e as suas subunidades ... 30
- Figura 8.** A. Modo de ação das celulases em celulose cristalina. B. Estrutura molecular da celulose 35
- Figura 9.** Série histórica de geração de resíduos ligninocelulósicos no Brasil. 44
- Figura 10.** Comercialização de celulases: a) Série histórica de importação (-) e exportação brasileira (--); b) Países para os quais o Brasil exportou em 2005; c) Países dos quais o Brasil importou em 2005..... 45

Figura 11. a) – Mapa da localização geográfica do município de São Desidério e da bacia hidrográfica do Rio São Desidério. b) - Mapa da localização do Sistema Cásrtico João Rodrigues, eda possível rota do rio subterrâneo João Rodrigues.....	49
Figura 12. Planta baixa, corte transversal e escala gráfica da Gruta do Catão, destacando a zona de entrada e zona de penumbra e os pontos amostrados (●) no interior da caverna .	50
Figura 13. Imagens das áreas amostradas. A) Meio epígeo, externa à Gruta do Catão; B) Zona de entrada da Gruta do Catão; C) Zona de Penumbra da Gruta do Catão, com destaque para o banco de argila.....	51
Figura 14. Desenho esquemático da amostragem realizada em cada quadrante, nos diferentes pontos amostrados.	52
Figura 15. Variação dos parâmetros químicos e biológicos estimados para o solo da Gruta do Catão em três pontos distintos: meio epígeo, Zona de entrada (ZE) e Zona de Penumbra (ZP).....	64
Figura 16. Análise de componentes principais destacando as variáveis que tem maior participação na distribuição dos dados.....	69
Figura 17. Fungos isolados do solo da zona de entrada da Gruta do Catão.....	70
Figura 18. Fungos isolados do solo da zona de penumbra da Gruta do Catão.	71
Figura 19. Índice enzimático de fungos filamentosos isolados do solo da Gruta do Catão, cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 7 e 14 dias a 25 °C.....	74
Figura 20. Atividade de diária de enzimas CMCCase, FPAse e B-glucosidase para a linhagem SDC 2.8 (<i>Aspergillus sp8</i>) e SDC 1.4 (<i>Aspergillus sp6</i>).....	86
Figura 21. Teor proteico e atividades enzimáticas de endoglucanase, B-glucosidase e FPAse em estratos brutos obtidos após fermentação em estado sólido.	89

Figura 22. Concentração de açúcares redutores nos extratos enzimáticos após 48 horas de cultivo em farelo de trigo. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela I Propriedades de algumas celulosas modelo. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela II Vantagens e desvantagens do processo de fermentação no estado sólido. 42

Tabela III Resíduos ligninocelulósicos gerados de diferentes fontes agrícolas. 43

Tabela I V. Parâmetros abióticos (temperatura, pH, Condutividade, oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos e umidade relativa do ar) obtidos na análise da água do rio João Rodrigues e do ar dos diferentes pontos amostrados. 63

Tabela V. Concentração diária de proteínas nos extratos brutos das linhagens isoladas da Gruta do Catão. 76

Tabela VI. Atividade diária de endoglucanase (IU/mL) de linhagens isoladas na zona de entrada e zona de penumbra da Gruta do Catão, BA. 77

Tabela VII. Dados referentes à produção de celulases por diversos microrganismos em diferentes condições de cultivo. 78

Tabela VIII. Atividade de β -glucosidase (IU/mL) para linhagens isoladas na zona de entrada e zona de penumbra da Gruta do Catão, BA. 80

Tabela IX. Atividade diária sobre Papel Filtro, FPAse (IU/mL) durante o cultivo (meio de Mandels Avicel 10%, 28 °C, 130 rpm) de linhagens isoladas na zona de entrada e zona de penumbra da Gruta do Catão,BA. 82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AN – Ágar nutritivo

CBH – celobiohidrolases

CBM – Carbono da biomassa microbiana

CECAV – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas

CMC – Carboximetilcelulose

CMCase – Atividade da endoglucanase

COT – Carbono orgânico total

Epg – Meio epígeo

FES – Fermentação em estado sólido

FPase – Atividade enzimática em papel filtro (celulase total)

FS – Fermentação submersa

FT – Farelo de Trigo

GH – glucano-hidrolases

GOD – reagente glucose-oxidase-peroxidase

GP – Grau de polimerização

IC – Índice de cristalinidade

IU – Unidade de atividade enzimática

NBM – Nitrogênio da biomassa microbiana

SCJR – Sistema Cárstico João Rodrigues

ZE – Zona de entrada

ZP – Zona de penumbra

INTRODUÇÃO

Os microrganismos possuem grande diversidade e capacidade de se adaptar, colonizando diferentes ambientes (Portillo & Gonzalez, 2008). Dentre esses ambientes, as cavernas podem ser consideradas oligotróficas extremas, com diferentes intensidades de luz e que proporcionam nichos ecológicos altamente especializados. Pouco se sabe sobre a distribuição, dinâmica populacional e bioquímica dos microrganismos das cavernas e grutas (Geric *et al.*, 2004; Northup & Lavoie, 2004). Dentre todos os microrganismos cavernícolas, os fungos são, de longe, os que predominam devido à sua elevada taxa de difusão de esporos, melhor sobrevivência e capacidade de colonização (Wang *et al.*, 2010). Atualmente já é de conhecimento científico que muitos fungos requerem um pulso de luz para iniciarem a sua esporulação (Tisch & Schmoll, 2010), tornando a limitação de luz uma barreira para a propagação e sobrevivência de muitas espécies de fungos. Ao contrário das plantas, os fungos utilizam a luz como uma fonte de informação (estimulando a expressão gênica, regulando a atividade enzimática e metabólica) e não como uma fonte de energia (Tisch & Schmoll, 2010).

As atividades enzimáticas, a densidade e a biomassa microbiana, são indicadores sensíveis que podem ser utilizados no monitoramento de alterações no solo em ecossistemas (Matsuoka *et al.*, 2003), sendo a microbiota a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos e pela ciclagem de nutrientes. Dentre esses indicadores, a biomassa microbiana se destaca para a avaliação da qualidade do solo, pois responde prontamente às mudanças ambientais, muitas vezes, mais cedo do que os parâmetros físicos e químicos, incluindo a quantidade de carbono orgânico total (Kaschuk *et al.*, 2009).

A principal função dos fungos no solo é a degradação da matéria orgânica, tendo um papel importante na degradação da celulose e lignina, gerando biomassa protéica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (Burke *et al.*, 2011). Sabendo que os rios subterrâneos contêm carbono orgânico dissolvido, matéria orgânica particulada e biopolímeros como celulose e lignina carreados do solo da superfície externa pela água de percolação (Culver & Pipan, 2009), podemos inferir que esse ambiente possui organismos que são capazes de hidrolisar esses biopolímeros em moléculas que podem ser assimiláveis aos microrganismos.

Dentre as várias atividades microbianas de interesse biotecnológico, a degradação de substratos lignocelulósicos é uma que tem sido foco de interesse por pesquisadores, pois possuem diversas aplicações na área industrial e ambiental. A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisado a glicose através de complexos enzimáticos, representando a maior fonte de carbono para o solo. O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e/ou rejeitos urbanos e também no tratamento de solos e efluentes diversos. Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade com os substratos.

A gruta do Catão é localizada no Parque Municipal da Lagoa Azul-BA e apresenta bom potencial ao espeleoturismo, porém ainda não possui um plano de manejo sustentável (Dantas *et al.*, 2013). Dessa forma o turismo em cavernas pode causar sérios impactos, como: enriquecimento do ambiente por matéria orgânica e inorgânica trazida pelos visitantes; pisoteamento da fauna e microbiota terrestre; compactação do solo; alteração da biodiversidade entre outros.

Vanderwolf *et al.* (2013) apontaram que existe uma lacuna no conhecimento sobre a diversidade microbiana em cavernas brasileiras e destacaram a importância da realização

de estudos sobre a distribuição das comunidades de fungos e sua relação com esses ambientes. Em contrapartida, o Centro Nacional de Proteção de Estudo e Gestão das Cavernas (CECAV) criou um termo de referência (CECAV / IBAMA, 2008) no qual exige uma variedade de estudos sobre a fauna e ecologia cavernícola brasileira, com pouca atenção para estudos microbiológicos. Pelo fato das cavernas serem ambientes ainda pouco estudados microbiologicamente, a atual problemática na determinação dos níveis de relevância para as cavernas brasileiras (de acordo com parâmetros ecológicos) é a falta de conhecimento do funcionamento do ecossistema subterrâneo.

Considerando o exposto acima, o estudo de microambientes pouco explorados, como as cavernas, nos permite adquirir um melhor entendimento sobre os processos ecológicos realizados entre os microrganismos e sua importância ecológica nesse ecossistema. Além disso, como as cavernas são considerados ambientes extremos, podemos explorar microrganismos com potenciais biotecnológicos e se possível utilizá-los em benefício de nossa sociedade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 AMBIENTES SUBTERRÂNEOS

A definição de caverna mundialmente aceita é descrita por Gillieson (1986) como sendo uma “cavidade natural em rocha – independente da litologia, que permite a passagem de um ser humano”. No entanto em estudos biológicos têm-se utilizado a definição de Culver & Pipan (2009), em que eles definem uma caverna como uma cavidade em rocha maciça, independente da litologia, e maior do que poucos milímetros de diâmetro.

O processo de formação das cavernas está diretamente relacionado à litologia na qual a cavidade se desenvolve. Cavernas em rochas carbonáticas geralmente são originadas através do processo de dissolução química, resultante da ação do ácido carbônico (H_2CO_3) em contato com o carbonato de cálcio ($CaCO_3$), um processo diferente da erosão, formando as paisagens cársticas. A atmosfera e o solo da superfície rico em matéria orgânica contêm dióxido de carbono (CO_2) em abundância. Quando a água da chuva passa por eles, se enriquece deste dióxido e torna-se bastante ácida, dando origem ao ácido carbônico (H_2CO_3). A água acidulada penetra pelas fendas da rocha calcária, dissolve o carbonato de cálcio e produz bicarbonato de cálcio ($Ca(HCO_3)_2$), solúvel e facilmente transportado pela água. Conforme o carbonato é dissolvido pela água, as fendas se alargam e criam vazios e condutos que se ampliam no interior do maciço rochoso, originando as cavernas. As paisagens cársticas são caracterizadas por apresentar sumidouros e ressurgências de rios, vales cegos, cavernas e dolinas (Culver & Pipan, 2009).

As cavernas podem ser divididas em diferentes zonas, sendo delimitadas pela quantidade de luz natural presente no local (Figura 1). Esse ecossistema podem apresentar

até três zonas distintas: i) a zona de entrada (ZE), onde há incidência direta de luz; ii) a zona de penumbra (ZP), onde há incidência indireta de luz, iii) zona afótica (ZA), onde a ausência de luz é constante.

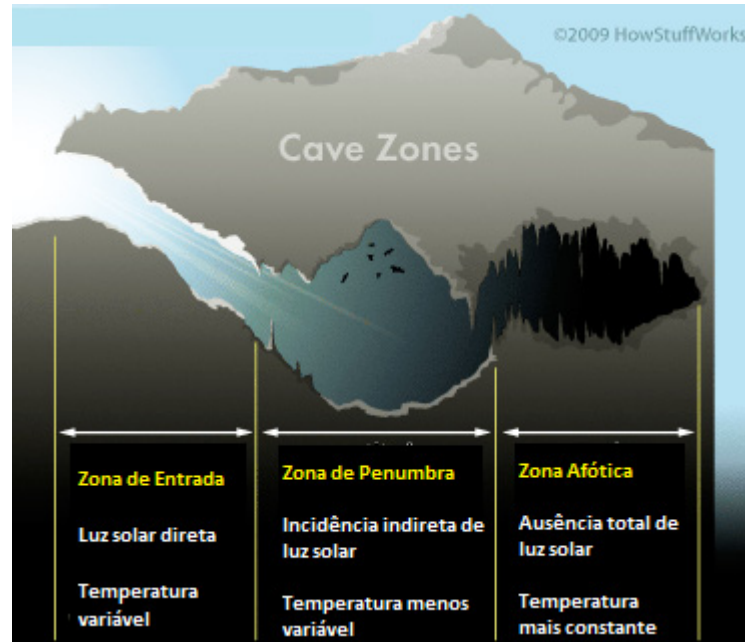


Figura 1. Divisão de uma caverna em zonas distintas, classificadas de acordo com a incidência de luz (modificado de HowStuffWorks:<http://science.howstuffworks.com/life/biology-fields/cave-biology2.htm>).

As cavernas são ambientes subterrâneos caracterizados por sua alta estabilidade ambiental, ou seja, fatores abióticos como temperatura e umidade sofrem poucas variações em determinadas regiões da mesma (Culver, 1982; Taylor *et al.*, 2009). Podem ser consideradas ambientes oligotróficos extremos e que proporcionam nichos ecológicos altamente especializados. Nelas, a concentração de carbono orgânico total normalmente fica abaixo de 0,5 mg por litro de água (Engel, 2007). Entretanto, nem sempre os valores são baixos, pois as cavernas muitas vezes recebem uma grande entrada de matéria orgânica através de água de gotejamento, enchentes, pela entrada de animais de ambientes externos e de suas excretas (Jurado *et al.*, 2010). A ausência parcial ou total de luz, em zonas mais

afastadas da entrada junto com a oligotrofia colaboram para a singularidade desses locais, principalmente do ponto de vista biológico.

As espécies restritas ao meio subterrâneo – denominadas troglóbias - são caracterizadas por uma série de especializações morfológicas, fisiológicas, ecológicas e comportamentais (Culver & Pipan, 2009). Dentre as especializações, as mais conspícuas são: a redução, até mesmo ausência, de olhos e de pigmentação melânica, observadas em organismos como planárias, gastrópodes, todos os grandes grupos de artrópodes terrestres, peixes e salamandras (Bichuette, com. pess.). Assim podemos considerar o ambiente subterrâneo um nicho altamente especializado, possuindo fatores limitantes que permitem a colonização por espécies adaptadas a tais condições físicas, químicas e biológicas.

As cavidades subterrâneas revelam uma considerável fragilidade e grande importância ambiental, especialmente no que diz respeito ao controle da qualidade, quantidade e periodicidade de oferta dos recursos hídricos, superficiais ou subterrâneos, e na manutenção e preservação de diversas espécies de vertebrados e invertebrados, dos quais vários se destacam com importante papel na dinâmica ambiental do ambiente subterrâneo ou mesmo do meio superficial.

Entretanto, o ecossistema cavernícola é constantemente visado pela exploração econômica dos seus recursos naturais, principalmente pela exploração mineral. Esse cenário gera um conflito entre as perspectivas de sua preservação/conservação e os apelos à exploração de seus recursos naturais ou mesmo à sua supressão.

A legislação ambiental brasileira apresenta dois instrumentos básicos relacionados à regulação do uso e à proteção do patrimônio espeleológico brasileiro: a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), nº347 de 2004, que destaca a importância de atributos ecológicos, ambientais ou socioeconômicos na identificação do

nível de relevância das cavidades; e o decreto nº. 99.556/1990, alterado pelo decreto nº. 6.640/2008, que define os diferentes graus de relevância para fim de enquadramento das cavidades e os níveis de proteção a que estão sujeitas, estendendo-se da preservação a supressão de cavidades.

Até dezembro de 2011, a base de dados geoespacializados do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Cavernas (CECAV) registrava cerca de 11.474 cavidades naturais subterrâneas, sendo que desse total aproximadamente 7.000 cavernas estão presentes em rochas carbonáticas (ICMBio, 2012). A Figura 2 apresenta um mapa destacando as regiões cársticas no Brasil e as cavernas catalogadas até dezembro de 2011 elaborado pelo CECAV, unidade descentralizada do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), voltada à pesquisa e conservação das cavidades naturais subterrâneas.

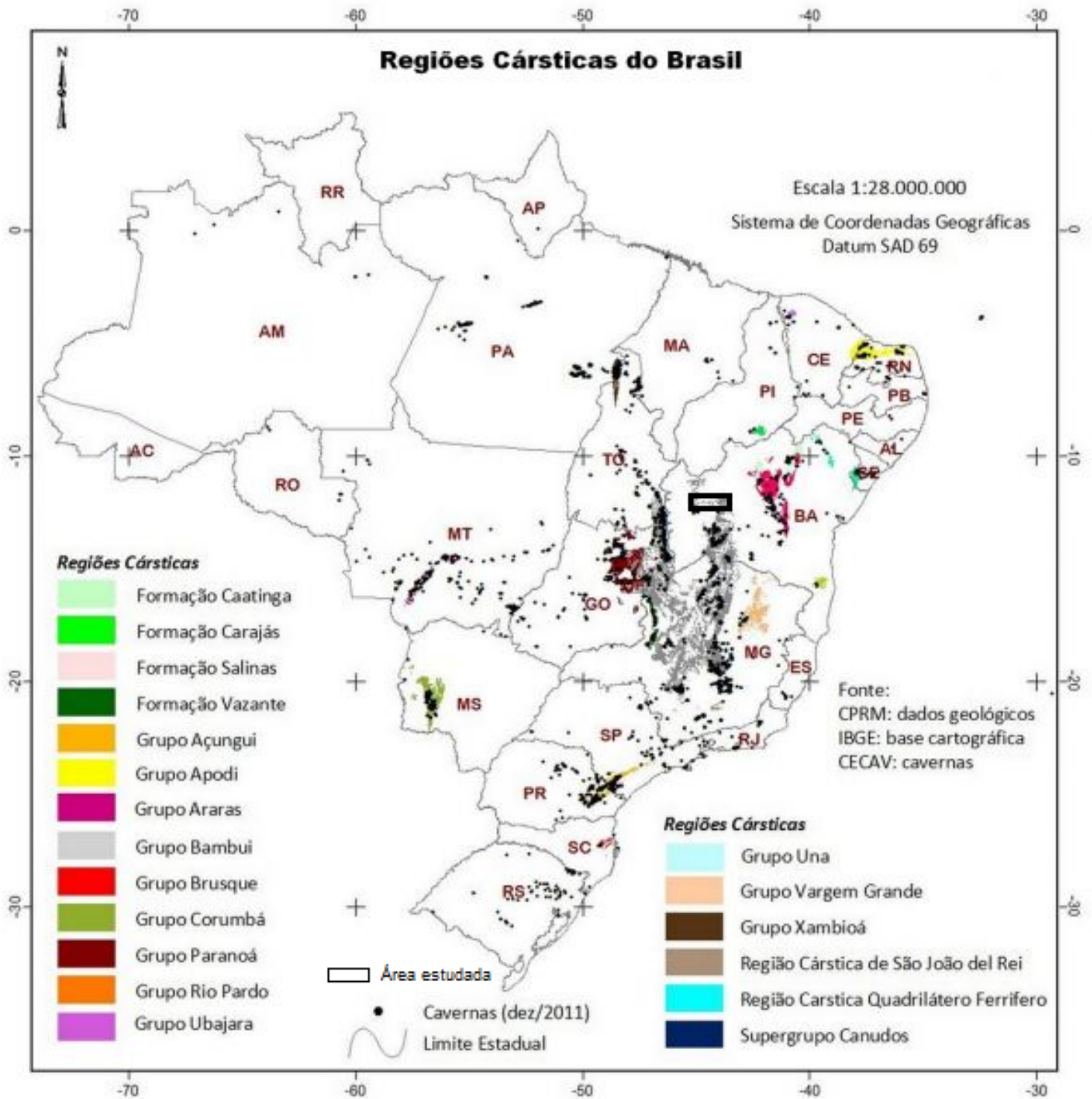


Figura 2. Mapa do Brasil destacando todas as áreas cársticas no país e as cavernas catalogadas até dezembro de 2011 junto ao CECAV. O — destaca a área cárstica estudada (modificado ICMBio, 2012).

1.2 MICRORGANISMOS NO SUBTERRÂNEO

O solo pode ser definido como um sistema complexo, dinâmico e vivo, que pode ser entendido como o resultado da combinação de matéria orgânica e mineral inconsolidados que fornece habitats a uma ampla variedade de organismos. Dentre eles, os microrganismos se adaptam a esse micro-habitats e formam consórcios, interagindo entre si e com outras partes da biota do solo (Torsvik & Oseras, 2002). O solo representa um ambiente altamente heterogêneo para a microbiota edáfica, sendo que a complexidade desse sistema é definida pelas interações entre os componentes físicos, químicos e biológicos que são modulados pelas condições ambientais do solo (Buscot, 2005).

Os microrganismos estão envolvidos em mais de 80% das reações que ocorrem no solo. Portanto, a comunidade microbiana do mesmo é essencial para a manutenção dos ecossistemas terrestres, pois é responsável pela dinâmica da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes nesse sistema, atuando na sua produtividade e qualidade (Moreira & Siqueira, 2006). Os processos de agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, estabelecimento de relações simbióticas e o controle de pragas e doenças são realizados com a participação efetiva dos microrganismos (Moreira & Siqueira, 2006).

O uso de técnicas independentes de cultivo tais como: contagem direta de células em microscópio, análise de ácidos graxos de fosfolipídeos (PLFA), reação em cadeia da polimerase-eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais (TRLFP), confirmam que os microrganismos cultiváveis representam apenas 0,1 a 1% de toda a biodiversidade microbiana existente no solo (Lambais *et al.*, 2005).

Uma considerável variedade de microrganismos pode ser encontrada em cavernas, como fungos filamentosos - principalmente em decorrência da alta umidade destes locais e temperatura praticamente estável -, bactérias heterotróficas - que exigem compostos orgânicos de carbono e nitrogênio como fontes de energia - e autotróficas - que utilizam exclusivamente o CO₂ como fonte de carbono; incapaz de decompor as substâncias orgânicas; oxida substâncias minerais como única fonte de energia para o seu desenvolvimento (Northup & Lavoie, 2001; Taylor *et al.*, 2009; Nováková, 2009; Jurado *et al.*, 2010).

Os microrganismos presentes nas cavernas podem ser classificados como residentes e transientes (Northup *et al.*, 2004). Os transientes são levados para as cavernas em correntes de ar, em fluxos da água, em insetos e normalmente sobrevivem onde a matéria orgânica é abundante e disponível. Os microrganismos residentes ocorrem como habitantes nativos de uma caverna. Em alguns casos estes microrganismos utilizam apenas os minerais presentes nas rochas e substratos, como é o caso de bactérias quimiolitotróficas (Sarbu *et al.*, 1996).

Os fungos, dentre os microrganismos, são os que predominam em ambientes cavernícolas. Os táxons de fungos mais relatados em ambientes subterrâneos são os *Ascomycota*, seguidos por *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Mycetozoa* e *Oomycota* (Vanderwolf *et al.*, 2013). A maior parte dos gêneros isolados nesse ambiente são organismos de ampla distribuição e saprofitos oportunistas, associados com solo, plantas ou insetos.

Os fungos em cavernas atuam principalmente nas interações tróficas como decompositores e/ou parasitas (Benoit *et al.*, 2004; Santamaria & Faille, 2007; Yoder *et al.*, 2009), disponibilizando nutrientes em formas assimiláveis para outros organismos e junto com as bactérias constituem as principais fontes de alimento para protozoários e

invertebrados troglóbios como isópodes e colêmbolas. A micobiota subterrânea também pode ser uma reserva importante de nutrientes inorgânicos pela solubilização de rochas e contribuir para a formação de espeleotemas (Cubbon, 1976).

A microbiota cavernícola é sensível a mudanças de fluxo de matéria orgânica de origem externa, causando um crescimento acelerado de algumas espécies oportunistas de fungos (Chellius *et al.*, 2009). Um grande número de estudos tem investigado o quanto o turismo interfere na diversidade de fungos em ambientes subterrâneos, comprovando que as visitas turísticas contribuem para o aumento da densidade e diversidade de esporos no ar e no solo (Vaughan-Martini *et al.* 2000, Wang *et al.*, 2010). Northup *et al.* (2000) comprovaram que a entrada de matéria orgânica pelas visitas turísticas suportam o crescimento de bactérias e fungos de origem externa ao ambiente subterrâneo, eliminando as espécies nativas e reduzindo a biodiversidade. Esse cenário também pode ocorrer quando ocorrem mudanças microclimáticas devido às visitas turísticas e iluminação artificial (Pulido-Bosh *et al.*, 1997).

Pulsos de inundações de rios subterrâneos são considerados um controle natural para muitas espécies de fungos terrestres em ambientes subterrâneos (Shacklette & Hasenclever, 1968; Vanderwolf *et al.*, 2013), alterando a composição e diversidade de fungos no solo cavernícola por até quatro meses após o período de inundação. Além disso, um estudo realizado por Tish & Schimoll (2010) destaca que mais de cem espécies de fungos reagem à presença/ausência de luz. Apesar de não haver nenhum estudo que tenha relacionado o gradiente de luminosidade em uma caverna com a diversidade micológica, já se sabe que a luz atua na indução à esporulação e influencia alguns processos metabólicos em fungos, como o metabolismo do DNA, ciclo celular, metabolismo de proteínas, carbono e nitrogênio e na biosínteses de carotenóides.

A distribuição de fungos ao longo de uma caverna é influenciada pela disponibilidade de matéria orgânica, pelas condições microclimáticas (disponibilidade água, temperatura, pH, entre outros) e por parâmetros como composição mineral, porosidade e permeabilidade da rocha (Gorbushina, 2007). Estudos têm demonstrado que a abundância de fungos difere entre a entrada e o interior da caverna, sendo que esses trabalhos não apresentaram um padrão de abundância verificado pelos autores (Koiraj *et al.*, 1999; Fernandez-Cortes *et al.*, 2011), demonstrando a necessidade de estudos mais detalhados pra um melhor entendimento da dinâmica e funcionamento dos ecossistemas subterrâneos.

Existem poucos estudos publicados referentes à micologia cavernícola. Em um levantamento realizado por Vanderwolf *et al.* (2013) foi contabilizado um total de 225 estudos publicados com essa temática. Desse total, 132 estudos foram conduzidos na Europa, 45 estudos na América do Norte, 25 na Ásia, 18 na América Central e América do Sul, 10 na África e 6 na Oceania. Os países com o maior número de publicações são Estados Unidos (37 estudos publicados), França (25), Itália (23), Espanha (19) e Grã-Bretanha (17). O mapa apresentado na Figura 3 foi elaborado pelo mesmo grupo de pesquisadores (Vanderwolf *et al.*, 2013) e apresenta essa distribuição de estudos micológicos em cavernas em diferentes países do globo.

Assim podemos verificar a grande ausência de estudos micológicos em cavernas da América do Sul, principalmente no Brasil. Através de estudos mais detalhados poderíamos comparar a diversidade e o funcionamento desse ecossistema em diferentes regiões do planeta e verificar se ocorre uma generalização da diversidade, composição e distribuição dos fungos cavernícolas e do seu papel atuante no funcionamento do ambiente subterrâneo.

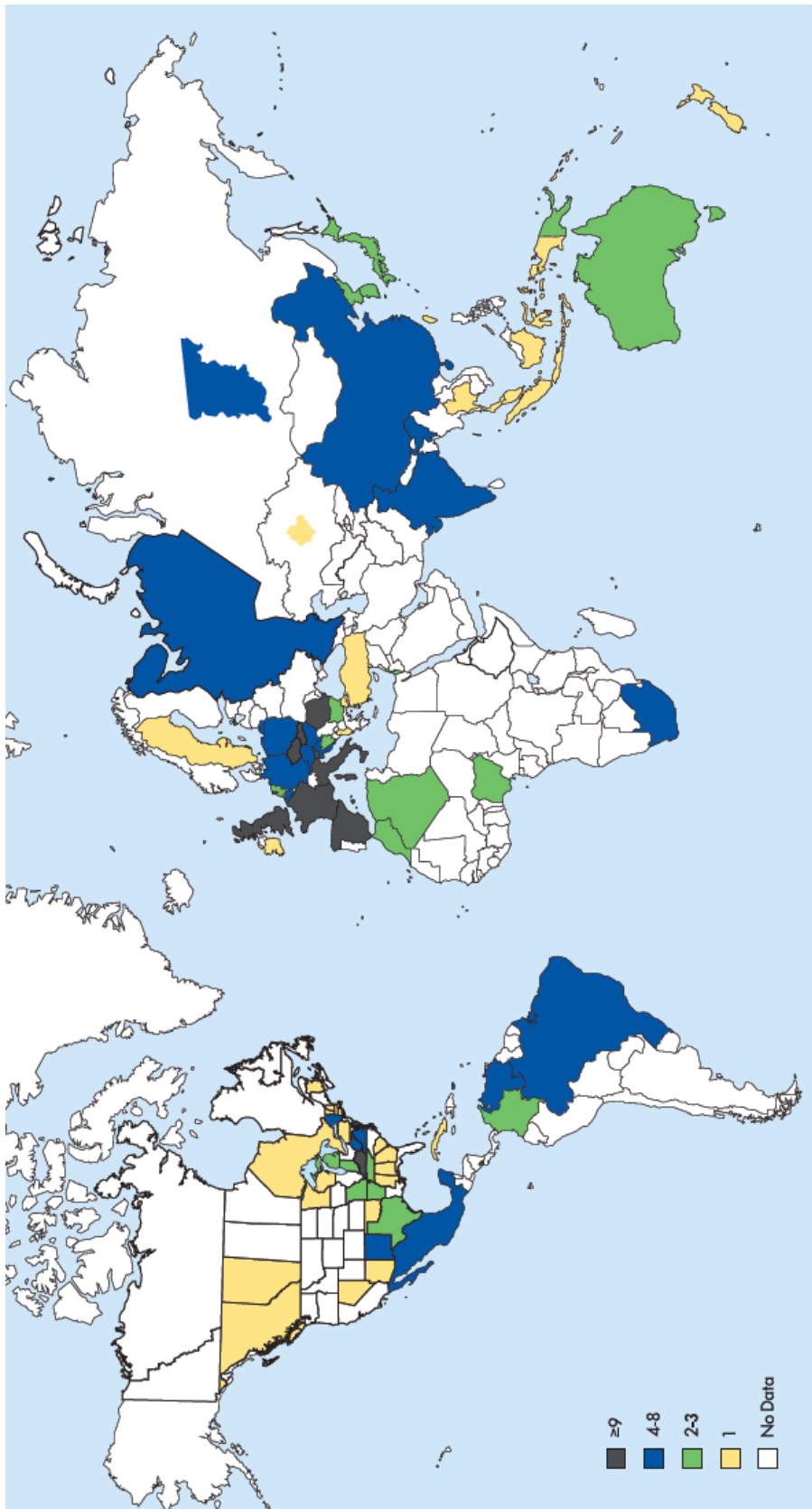


Figura 3 Distribuição de 225 estudos micológicos em cavernas ou minas. Cada localidade foi categorizada em: sem estudos (no data), 1 estudo, 2-3 estudos, 4-8 estudos, ou ≥ 9 estudos (Vanderwolf *et al.*, 2013).

1.3 BIOMASSA VEGETAL

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante na Terra (Bhat & Bhat, 1997) e o principal polímero constituinte da parede celular das plantas, representando cerca de 35-50% do peso seco da biomassa lignocelulósica, variando de acordo com o tipo de célula e a maturidade da planta (Lynd *et al.*, 2002). Acreditava-se que plantas e algas eram as fontes mais importantes da produção de celulose, mas já foi documentado que organismos não fotossintéticos como algumas bactérias, invertebrados marinhos, fungos e amebas produzem uma grande quantidade dessa celulose na biosfera. A cada ano mais de 10^{11} toneladas de CO_2 são fixados por meio da fotossíntese derivada de material vegetal, e metade desse material consiste em celulose (Filho, 2008).

A celulose nas plantas está fortemente ligada a outros dois biopolímeros (hemicelulose e lignina). Os três juntos representam mais de 90% do peso seco da célula vegetal. Em média, a proporção de hemicelulose e lignina observada na biomassa lignocelulósica é de 30% e 25% respectivamente.

A hemicelulose é composta por polissacarídeos amorfos de baixa massa molecular (grau de polimerização), apresentando uma estrutura heteropolissacarídica, ramificada, bem definida que é formada, principalmente, por blocos de pentose (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metil-glucorônico e galacturônico) e radicais acetila (Castro, 2010)(Figura 4).

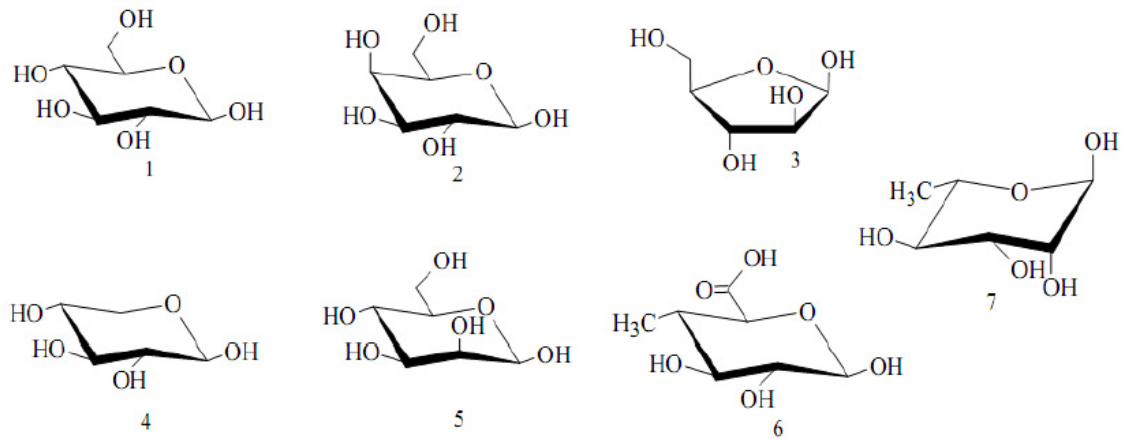


Figura 4 Monossacarídeos constituintes da hemicelulose: D-glucose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), 4-O-metil-D-glucorônico (6), E-L-ramnose (7). (Saha, 2005).

A lignina é uma macromolécula, ramificada e amorfa, constituída predominantemente de compostos aromáticos com cadeia altamente irregular, e tem como função primária promover o suporte estrutural da planta e envolver as moléculas de celulose e hemicelulose tornando-as de difícil acesso (Zúniga, 2010). Possui natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura aromática de natureza fenólica, denominado na maioria das vezes de polifenólicos, dentre eles acetovalinina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzaldeído, ácido siríngico, ácido vanílico, hidroquinona e valina (Figura 5)(ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

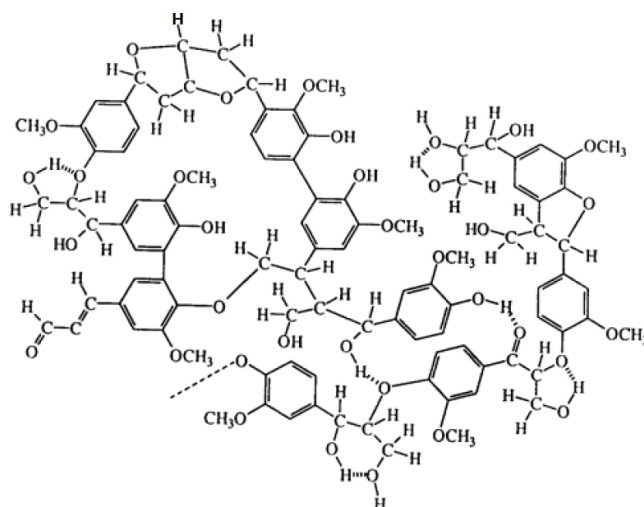


Figura 5 Estrutura hipotética de lignina (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990).

A celulose é um polímero linear formado por subunidades de *D*-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, formando longas cadeias unidas entre si por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, originando unidades maiores, denominadas microfibrilas de celulose. As microfibrilas de celulose são conectadas de forma ordenada que não só as enzimas celulolíticas, mas até mesmo moléculas muito pequenas como a água não conseguem penetrar nesse complexo celulolítico. Por outro lado, algumas partes das microfibrilas de celulose são menos ordenadas, estruturas não cristalinas designadas como regiões amorfas (Arantes & Saddler, 2011). As regiões amorfas são menos resistentes a degradação, portanto mais susceptíveis a ação das enzimas do que as regiões cristalinas (Figura 6). Essa cadeia linear é constituída de forma que cada resíduo de glicose fique invertido 180° em relação ao resíduo de glicose vizinho, portanto é a celobiose, e não a glicose, a unidade básica de repetição da celulose (Delmer & Amor, 1995) como demonstra a Figura 7.

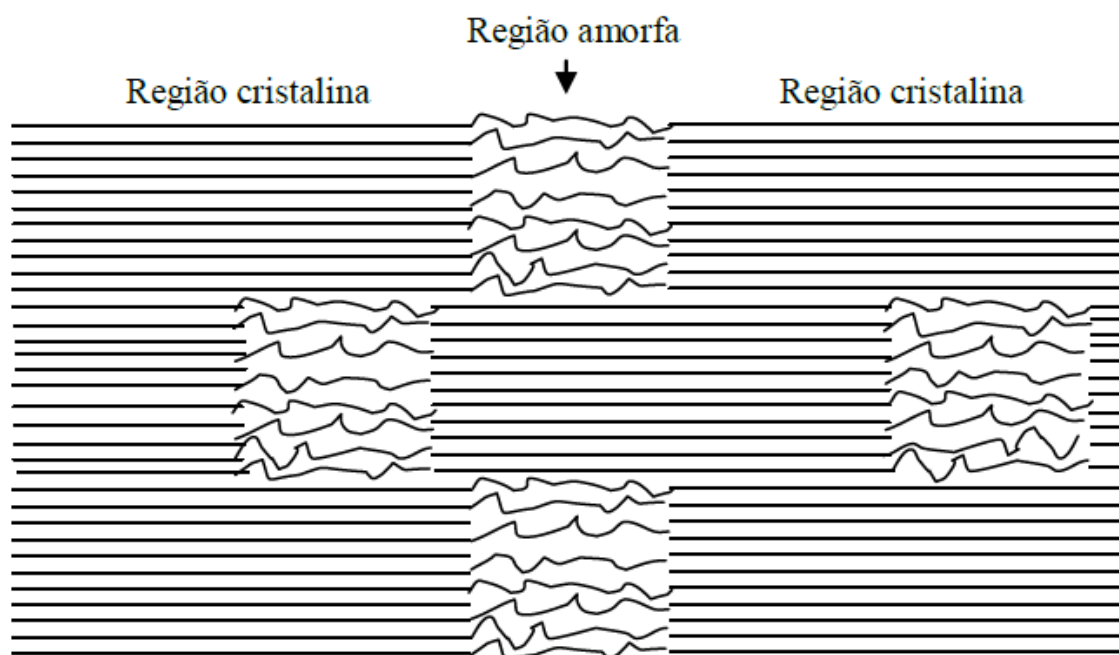


Figura 6 Estrutura esquemática de uma fibrila de celulose, destacando as regiões amorfas e cristalinas (Filho, 2008).

Duas importantes propriedades que auxiliam na diferenciação e classificação dos polímeros celulósicos são o grau de polimerização (GP) e o índice de cristalinidade (IC). O GP informa a frequência relativa das ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de endo e exoenzimas, respectivamente. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero. Já o IC está associado à reatividade do substrato. Assim quando substratos lignocelulósicos sofrem algum pré-tratamento (físico ou químico), afim de aumentar a hidrólise enzimática do mesmo, ocorre, geralmente, reduções nos valores de IC e GP. Moléculas com GP menor que seis são solúveis em soluções aquosas, enquanto que as moléculas com GP entre seis e quatorze são levemente solúveis (Castro, 2006). Assim, a resitência do substrato à hidrólise é definida pelo grau de polimerização e pelo índice de cristalinidade entre cada fibra de celulose, estabilizada pelas inúmeras pontes de hidrogênio. Algumas das celulosas utilizadas em ensaios laboratoriais são listados na Tabela I, ilustrando as diferentes características que favorecem ou dificultam a ação das celulasas, cujos resultados podem indicar a atividade de determinadas enzimas.

Tabela I Propriedades de algumas celulosas modelo (Zhang, 2006).

Substrato	IC	GP	FA (%)
Celodextrina	n.d.	2 – 6	100
CMC	n.d.	100 – 2000	100
Algodão	0,8 - 0,95	1000 – 3000	0,2
Papel Filtro Whatman nº 1	~ 0,45	750 – 2800	1,8
Celulose cristalina	0,5 - 0,6	150 – 500	0,6
Celulose bacteriana	0,8 - 0,95	600 – 2000	6,0
Substratos lignocelulósicos pré-tratados	0,4 - 0,7	400 – 1000	0,6

(IC) índice de cristalinidade, (GP) grau de polimerização, (FA) fração de ligação β -glicosídica acessível às celulasas.

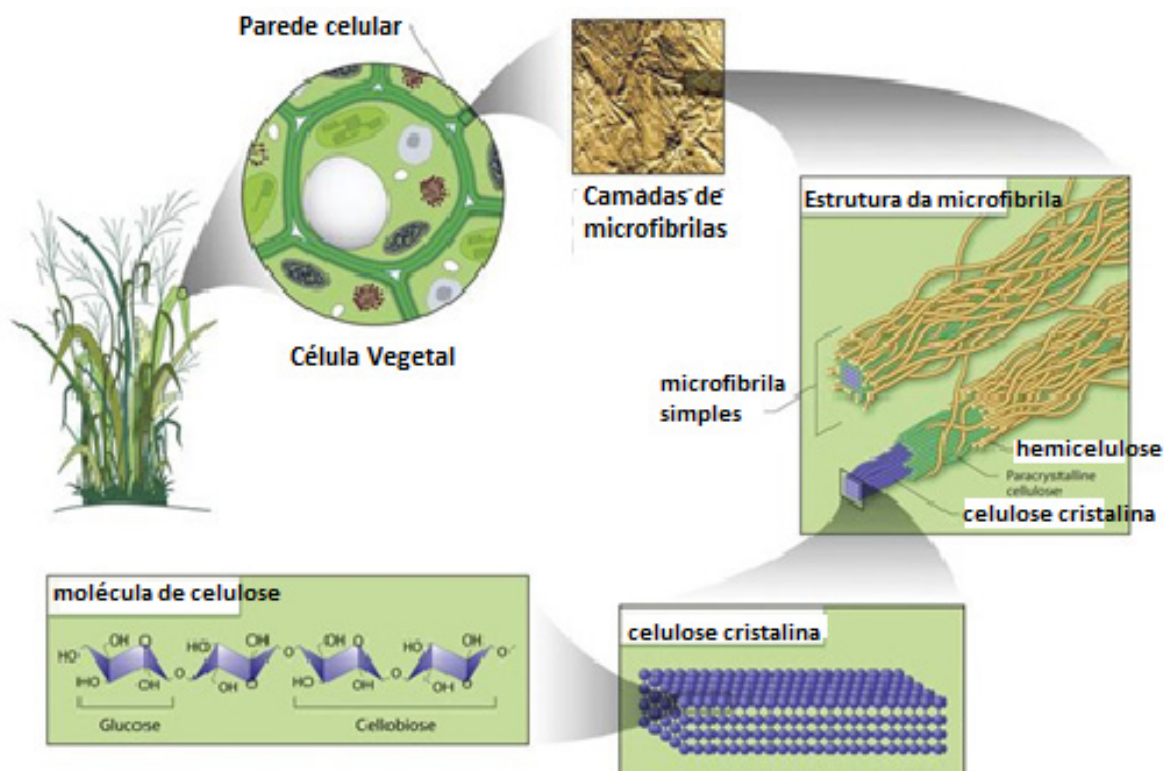


Figura 7 Representação esquemática das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas. Em destaque a molécula de celulose e as suas subunidades (Fonte: petrofutoficinadebioetanol.blogspot.com).

O Brasil, graças à sua variada atividade industrial e agrícola, possui uma grande variedade de resíduos agroindustriais cujo bioprocessamento seria de grande interesse econômico e social, entre eles tem-se: as indústrias de papel e celulose, serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana-de-açúcar) e, de um modo geral, unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas, como a palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros (Ramos, 2001). A utilização destes resíduos em bioprocessos, além de uma alternativa para obtenção de energia com base em matéria orgânica renovável (biomassa), é uma opção sustentável para solucionar o problema da poluição ambiental.

A sacarificação da celulose pode ser realizada por duas vias: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida utiliza um ácido concentrado ou diluído, porém esse

processo é limitado com baixo rendimento na produção de açúcares e alguns casos produzem substâncias tóxicas aos microrganismos (Castro, 2006).

A hidrólise enzimática utiliza celulases na hidrólise da celulose e ocorre em condições mais suaves de pressão, temperatura e pH em relação aos processos químicos citados acima. Como exibe elevada especificidade, essa técnica elimina a chance de produzir substâncias tóxicas, como furfurais, não acarretando problemas às células microbianas que serão utilizadas para o processo de fermentação. Essas enzimas são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas e trata-se de um complexo de enzimas (Silva, 2010). Todo organismo que degrada celulose cristalina secreta um sistema de celulases. Esses sistemas são compostos de uma variedade de enzimas com diferentes especificidade e modo de ação, atuando em sinergismo para quebra da celulose, criando sítios acessíveis umas para as outras e diminuindo problemas de inibição pelos produtos da hidrólise (Beguin, 1990).

1.4 MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Na natureza, o ciclo do carbono ocorre por meio de microrganismos celulolíticos, incluindo fungos, leveduras e bactérias provenientes de uma variedade de habitats. A quebra da celulose raramente ocorre por meio de um processo isolado, atuando então um ataque conjunto desses organismos sobre um composto complexo de celulose unido à lignina e hemicelulose. A ação combinada das enzimas extracelulares com especificidade complementar é essencial (Fillho, 2008). A característica semicristalina da celulose faz com que sua degradação seja considerada um obstáculo à ação de microrganismos, os quais não são capazes de assimilar agregados moleculares deste tamanho.

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se um dos focos principais das pesquisas nas últimas décadas, devido a utilização

dos mesmos nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria (Delabona, 2011), que vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial.

Na natureza existe uma variedade de microrganismos que produzem celulase, e dentre estes apenas alguns são conhecidos como celulolíticos verdadeiros, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Nesse grupo inclui-se bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Romnococcus*) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Aspergillus*, etc), além de plantas (*Fragária*) e animais (moluscos, insetos) (Lynd *et al.*, 2002).

Os fungos, juntamente com as bactérias heterotróficas, são os principais responsáveis pela reciclagem e decomposição de matéria orgânica dos ecossistemas. Os fungos filamentosos secretam enzimas digestivas no substrato onde crescem, hidrolisando grandes moléculas, como a celulose, em moléculas suficientemente menores para serem absorvidas pela célula fúngica, nutrindo-se dessa forma por absorção.

Em geral, os fungos que decompõem materiais lignocelulósicos ocorrem no solo, colonizando vegetais, raízes e seus resíduos, com importante função de reciclagem (Filho, 2008). Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, entretanto apenas alguns são conhecidos como celulolíticos verdadeiros, isto é, que são capazes de degradar a celulose natural. Os principais gêneros de fungos filamentosos descritos como produtores de celulases são *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (Zhang *et al.*, 2006; Singhania *et al.*, 2010).

Os fungos degradadores de materiais celulósicos podem ser divididos em três grupos distintos: fungos da degradação branca, da degradação marrom e da degradação branca, classificados de acordo com a morfologia da degradação.

- Fungos da degradação branca – a maior parte desse grupo corresponde a basidiomicetos e oxidam compostos fenólicos, relacionados à lignina, que está principalmente associada a enzimas extracelulares lignocelulolíticas (Jorgensen *et al.*, 2005).
- Fungos da degradação marrom – esses fungos promovem a degradação dos polissacarídeos de celulose e hemicelulose, e deixam a lignina intacta. Com essa característica, o material restante desse processo tem uma coloração amarronzada e frágil (Filho, 2008).
- Fungos da degradação branca – geralmente pertencentes à classe dos Ascomycetos e Deuteromicetos, esses fungos podem causar a degradação celulolítica de forma suave (Jorgensen *et al.*, 2005). Essa degradação ocorre pela penetração fina das hifas fúngicas nas camadas da parede celular. Esses fungos são mais eficientes na despolimerização de compostos sintéticos de lignina (Filho, 2008).

Ao longo dos anos contribuições científicas vêm sendo dadas progressivamente, quando discutimos o isolamento de fungos produtores de enzimas celulolíticas, e também em relação à demonstração do potencial ambiental e industrial dessas enzimas (Sánchez, 2009; Liu *et al.*, 2011). As enzimas microbianas que hidrolisam de forma eficiente oligo e polissacarídeos, são classificadas de acordo com alguns critérios como a especificidade ao substrato e no seu modo de ação.

As glicosil hidrolases (GHs), como são classificadas as celulases, fazem parte de um grande grupo de enzimas que realizam a hidrólise entre dois ou mais carboidratos. Com base na especificidade ao substrato essas enzimas podem ser classificadas com critérios estabelecidos pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB). As enzimas do complexo celulolítico, em particular as expressas por fungos, têm sido classificadas em

três grandes grupos, de acordo com seu modo de ação catalítico, e mais recentemente com suas propriedades estruturais. Dessa forma são encontrados três classes principais: as Endoglucanases, Exoglucanases (celobiohidrolases) e β -glucosidases (Lynd *et al.*, 2002; Castro, 2010).

- Endoglucanases (EG) - são as enzimas responsáveis pelo início da hidrólise, clivando a cadeia de forma randômica em regiões amorfas da celulose, liberando oligossacarídeos de vários graus de polimerização e novos terminais, sendo um redutor e outro não redutor. São responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), devido a sua fragmentação em oligopolissacarídeos (Lynd *et al.*, 2002)
- Exoglucanases (ExG) - esse grupo é formado pelas celobiohidrolases (CBHs), atuam na fibra celulósica ($GP > 3$) de maneira progressiva sobre os terminais redutores e não redutores, liberando celobiose pelas CBHs como seu principal produto. De acordo com Lynd *et al.* (2002) as exoglucanases podem possivelmente atuar de forma a ‘descamar’ a estrutura da celulose microcristalina, acarretando na desestratificação das fibras celulósicas, aumentando as regiões intersticiais. As CBHs ainda podem ser divididas em dois tipos: enzimas do tipo I (CBHs I) que atuam na extremidade redutora (R) da cadeia de celulose, enquanto que as enzimas do tipo II (CBHs II) clivam na extremidade não redutora (NR).
- β -glucosidases (β G) - são responsáveis pela hidrólise de celobiose e oligossacarídeos solúveis ($GP \leq 6$) em glicose. Essas enzimas são geralmente responsáveis pela regulação do processo de hidrólise da celulose, atuando como fator limitante na velocidade da reação durante a hidrólise enzimática. Essa classe enzimática não somente produz glicose como também reduz a inibição das

celobiohidrolases pela celobiose, dando maior eficiência a todo processo. No entanto, também são inibidas por altas concentrações de glicose (Lynd *et al.*, 2002).

Essas três classes de enzimas não hidrolisam de forma eficiente o substrato celulósico separadamente, sendo necessária uma ação sinérgica entre elas (Figura 8). Sinergismo é determinado quando a atividade exibida por uma mistura de componentes é maior do que a soma das atividades desses componentes avaliados separadamente (Wood *et al.*, 1979 in: Filho, 2008).

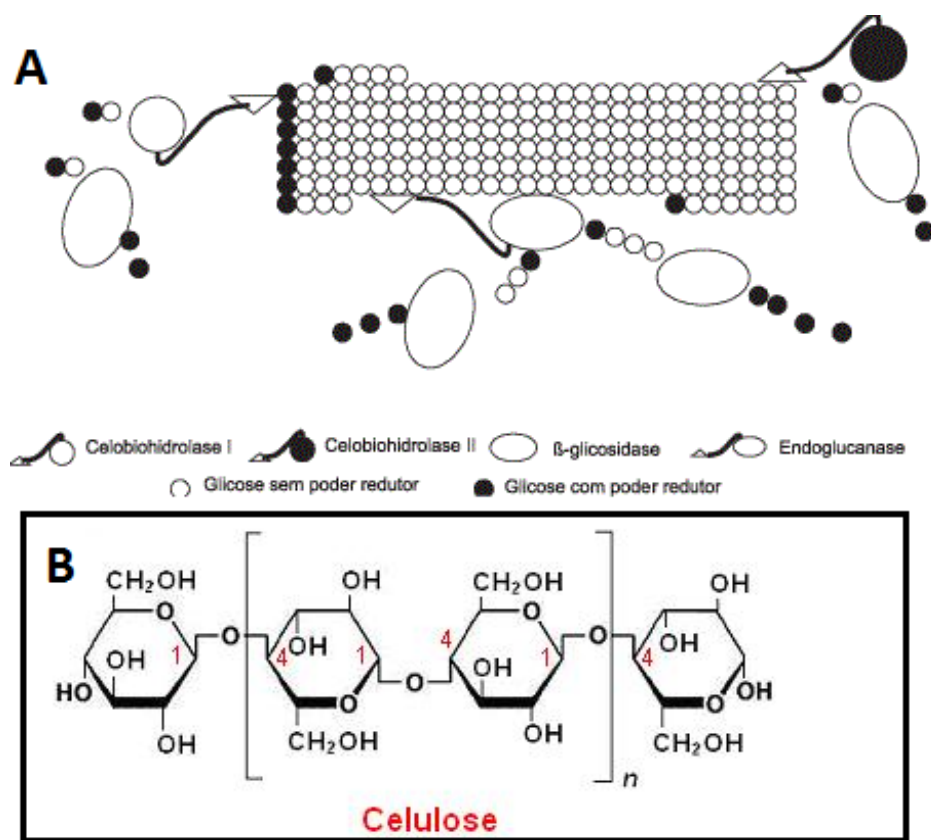


Figura 8 A. Modo de ação sinérgico das celulasas em celulose cristalina. B. Estrutura molecular da celulose (modificado de Voltatodio, 2012).

Para a ação dessas enzimas, são conhecidas pelo menos três formas de sinergia (Lynd *et al.*, 2002; Castro, 2006):

Sinergia EG-ExG – a ação das endoglucanases nas regiões amorfas da fibra celulósica, disponibilizam terminais redutores e não redutores para atuação das CBH I e CBH II, respectivamente;

Sinergia ExG-ExG – a ação das CBH I e CBH II são simultâneas na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados pela ação das endoglucanases;

Sinergias ExG-βG e EG-βG - as celobiohidrolases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos como seus produtos de hidrólise, respectivamente, que são substratos para as β-glicosidases.

A viabilidade para uso comercial das celulases depende: da alta produtividade, utilização de substratos mais baratos, baixo custo de produção e que a produção em massa seja praticável.

1.5 APLICAÇÃO DAS CELULASES

Embora exista relatos da utilização de enzimas celulásicas na modificação de polpas celulósicas datados do ano de 1959, a produção dessas enzimas em escala industrial começou em meados da década de 80, como um aditivo para ração animal e, em seguida, com outras aplicações na indústria de alimentos. Um pouco mais tarde, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas indústrias têxteis, de polpa e papel e em lavanderia (Castro, 2006).

Durante as duas últimas décadas o uso dessas enzimas tem crescido consideravelmente, chegando as celulases e hemicelulases a representar atualmente, mais de 20% do mercado mundial enzimático (Bhat, 2000). A seguir são descritas as principais aplicações das enzimas celulolíticas no âmbito industrial.

a) Indústria alimentícia

As celulases são usadas na extração de suco de frutas e óleos de grãos, na clarificação de sucos, para aumentar a absorção da água dos cereais, remoção da camada protetora da soja na produção de alimentos fermentados como molho de soja (*shoyu*).

As celulases também são utilizadas afim de favorecer a qualidade dos alimentos, atuando na remoção da parede celular de vegetais e frutas facilitando a liberação de sabor e aroma, enzimas, polissacarídeos e proteínas (Bhat, 2000).

b) Indústria de bebidas e sucos

Utilizada na produção de sucos de frutas, as celulases são adicionadas para promover a hidrólise parcial de componentes da parede celular, reduzindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos. Dessa forma, obtém-se uma melhora na liberação de componentes desejáveis, como aromas e antioxidantes. Ainda, as celulases promovem a clarificação dos sucos, pela remoção de partículas pequenas em suspensão. O uso de celulases aumenta a conversão das frutas em sucos de 5 a 15%, reduzindo a geração de resíduos sólidos, além de converter as fibras em açúcares solúveis, promovendo uma maior recuperação total dos sólidos do suco (Tolan & Foody, 1999).

c) Indústria de ração animal

As celulases são utilizadas para aumentar a digestibilidade das rações, atuando sinergicamente com as enzimas que existem naturalmente no sistema digestivo dos animais (amilases, proteases e outras glucanases), eliminando fatores anti-nutricionais presentes em grãos e vegetais e aumentando o valor nutricional dos alimentos. Como consequência ocorre um aumento no ganho de peso e uma melhora no desempenho dos animais, em especial os ruminantes e monogástricos (Bhat, 2000).

Elas podem ser adicionadas diretamente na forma líquida ou na forma de pequenos grãos. Na alimentação de frangos e porcos, que é a principal aplicação das celulases nesse setor, as referidas enzimas atuam juntamente com as xilanases na redução da viscosidade de polissacarídeos, em especial glucanas, encontradas no trigo e na cevada ingeridos por esses animais, resultando em uma melhora de seu funcionamento intestinal (Tolan & Foody, 1999).

d) Indústria têxtil

A aplicação das enzimas celulolíticas na indústria têxtil baseia-se na remoção do excesso de corante em jeans (bioestonagem), remoção de microfibrilas que se prendem as malhas de algodão após os ciclos de lavagem e restaurar a maciez e brilho dos tecidos (biopolimento) (Tolan & Foody, 1999; Castro, 2006).

e) Indústria de papel e polpa

As celulases são aplicadas na indústria de papel e polpa para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa, hidrólise parcial de carboidratos, liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas e hidrólise de colóides no processamento do papel (Jefries *et al.*, 1996). No processo de reciclagem do papel as enzimas celulolíticas são utilizadas no biodescoloramento, reduzindo as concentrações de algumas substâncias químicas que eram utilizadas nesse processo, como peróxido de hidrogênio, hidrossulfito de sódio ou até alvejantes mais agressivos como ozônio e dióxido de cloro (Tolan & Foody, 1999).

f) Limpeza doméstica

Nesse segmento as celulases são adicionadas durante a formulação de sabão em pó para aumentar o brilho das cores, remover sujeiras das fibras de algodão, aumentar a maciez dos tecidos e, principalmente, amenizar o desgaste dos tecidos. Também nesse setor as celulases possuem importante papel na redução de problemas ambientais

ocasionados pela utilização de amaciantes catiônicos (Castro, 2006). O maior desafio para uma aplicação mais ampla das celulases nessa indústria ainda é o custo de produção, que representa cerca de 0,4% do custo total de produção dos detergentes (Bhat, 2000).

g) Biorrefinarias

A biorrefinaria é o nome dado ao processo em que se utiliza materiais renováveis (biomassa ligninocelulósica) e seus resíduos, numa forma mais integrada e diversificada para a produção de combustíveis, produtos químicos e energia, gerando o mínimo de resíduos e de emissões de gases poluentes. Nesse contexto, a biorrefinaria apresenta uma rota promissora para criação de uma indústria baseada em biomassas, onde os produtos, produtos secundários e resíduos da agricultura e agroindústria, serão base para diferentes processos (Pereira Jr, 2008).

Apesar das biorrefinarias não serem economicamente viáveis no patamar tecnológico atual, diversas plantas pilotos estão operando e outras estão sendo construídas para buscar as respostas necessárias para a implantação dessas unidades em escala industrial de produção do bioetanol de segunda geração.

1.6 PROCESSOS FERMENTATIVOS

As duas principais estratégias para a produção de celulases são a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), que diferem entre si em relação às suas condições ambientais e formas de condução.

Entre esses processos a FS tem sido a mais utilizada, no entanto, nos últimos anos têm aumentado a tendência do uso da FES para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos (Lever *et al.*, 2010; Singhanian *et al.*, 2010). Tanto o processo de FES e quanto o de FS apresentam características importantes que devem ser consideradas para avaliar as vantagens e

desvantagens de cada processo dependendo do tipo de produto desejado e o grupo de microrganismos utilizados (Delabona, 2011).

Um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional. Na FES há ausência ou a quase ausência de água livre (Castro, 2006). A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida na superfície das partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30-85% (Raimbault, 1998).

A água possui diversas funções em um bioprocessos, tais como: a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos; a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos e a conservação da permeabilidade da membrana plasmática. Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias metabólicas, afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimatação celular (Raimbault, 1998). Por outro lado, maiores níveis de umidade podem levar a aglomeração de partículas, limitando a transferência de gás e aumentando a competição caso seja uma cultura mista (Krishina, 2005).

Na FS a água chega a constituir cerca de 90-99% da massa total do material a ser fermentado. Dentre as principais vantagens dos processos FS frente a FES temos (Castro, 2006):

- Fácil inoculação das células e possibilidade de operação contínua do bioprocessos;
- O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle da temperatura de cultivo, reduzindo a perda do produto, em especial se esse for uma enzima;

- Os processos difusionais e de mistura são facilitados pelo caráter homogêneo do sistema;
- Há uma ampla divulgação de informações sobre cinéticas de crescimento e produção e fenômenos de transporte;
- Um processo facilitado de purificação do produto pela ausência de partículas de substrato;
- Existência de tecnologias de monitoramento de variáveis *on line* disponíveis; e
- Facilidade no controle do processo e adição de soluções desejadas;

Segundo Couto & Sanromán (2005) e Singhania *et al.* (2010) a definição de fermentação no estado sólido é o processo em que os microrganismos crescem em substratos sólidos na ausência de líquido entre as partículas. De acordo com Auria *et al.* (1993) a FES é um processo com um sistema de quatro fases: a fase contínua é o ar ou de uma mistura de gases que flui através das camadas de um substrato sólido; a fase sólida é composta por uma parte insolúvel em água que contém uma solução aquosa de nutrientes; essa solução é fortemente absorvida dentro da matriz insolúvel; e a quarta fase é o microrganismo que cresce no interior do suporte e/ou na sua superfície ou no interior dos espaços livres.

Além da umidade ótima da FES existem vários fatores que afetam o processo de fermentação, dependendo do tipo de substrato e dos microrganismos utilizados, e também sobre a escala do processo. O principal fator limitante da FES refere-se a dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição, ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (Couto & Sanromán, 2005; Delabona, 2011). A Tabela II destaca os principais

aspectos positivos e negativos na utilização da FES em processos para obtenção de produtos enzimáticos.

Tabela II Vantagens e desvantagens do processo de fermentação no estado sólido (Krishna, 2005; Singhanian *et al.*, 2005; Delabona, 2011).

Vantagens	Desvantagens
O meio de cultivo é simples, na maioria das vezes natural. Condições próximas às naturais.	Pré-tratamento do substrato pode ser necessário em alguns casos, podendo modificar negativamente a estrutura do substrato
Efluentes líquidos reduzidos	Difícil regulação dos parâmetros de cultivo (pH, umidade, temperatura, etc)
Diminuição das contaminações devido à baixa umidade	Possibilidade de elevação excessiva de temperatura (falta de transferência de calor e perda de umidade em processos mais longos)
Fácil aeração devido à porosidade do substrato; baixa demanda de energia	

A utilização de inúmeros materiais orgânicos como resíduos agrícolas, florestais e da indústria alimentícia tem sido proposta como substratos para a FES (Kalogeris *et al.*, 2003). A utilização desses resíduos promovem um substrato alternativo e barato para a fermentação e a redução de problemas ambientais causados pelo grande acúmulo de biomassa lignocelulósica produzidos pela agroindústria (Couto & Sanromán, 2005). Alguns resíduos agroindustriais como o farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz e farelo de mandioca já vêm sendo utilizados com sucesso como substratos na produção de enzimas por FES (Singhanian *et al.*, 2010; Chen & Qiu, 2010). A Tabela III ilustra o levantamento da produção mundial de diferentes resíduos lignocelulósicos derivados de fonte agrícola.

Tabela III Resíduos lignocelulósicos gerados de diferentes fontes agrícolas (Sanches, 2009).

Resíduos lignocelulolíticos	10⁶ toneladas/ano
Bagaço de cana-de-açúcar	317 – 380
Palha de milho	159 – 191
Casca de arroz	157 – 188
Farelo de Trigo	154 – 185
Farelo de soja	54 – 65
Fibra de algodão	17 – 20
Farelo de feijão	4,9 – 5,9
Farelo de café	1,6 – 1,9

1.7 RESÍDUOS LIGNOCELULOLÍTICOS

O Brasil é um país onde a agricultura é a principal atividade econômica e os resíduos e os subprodutos agrícolas e agroindustriais são abundantes, e são pouco aproveitados para a geração de energia, enquanto uma grande parte ou é queimada ou é simplesmente depositada no campo, tornando-se muitas vezes um problema ambiental (Delabona, 2011).

Em relação a esse problema, a Figura 9 apresenta séries históricas de geração de materiais lignocelulósicos no Brasil entre os anos de 1990 - 2005, com as massas representadas em base úmida (Faostat, 2006). O bagaço de cana-de-açúcar, dentre as biomassas consideradas, é a predominante, com uma geração em 2007 de 147 milhões de toneladas. Igualmente, é notória a quantidade gerada das demais biomassas lignocelulósicas: juntos, no ano de 2007, os materiais apresentados na Figura 9 somaram uma massa gerada no Brasil de 606 milhões de toneladas, das quais cerca de 105 milhões de toneladas correspondem à fração celulósica (Castro & Junior, 2010).

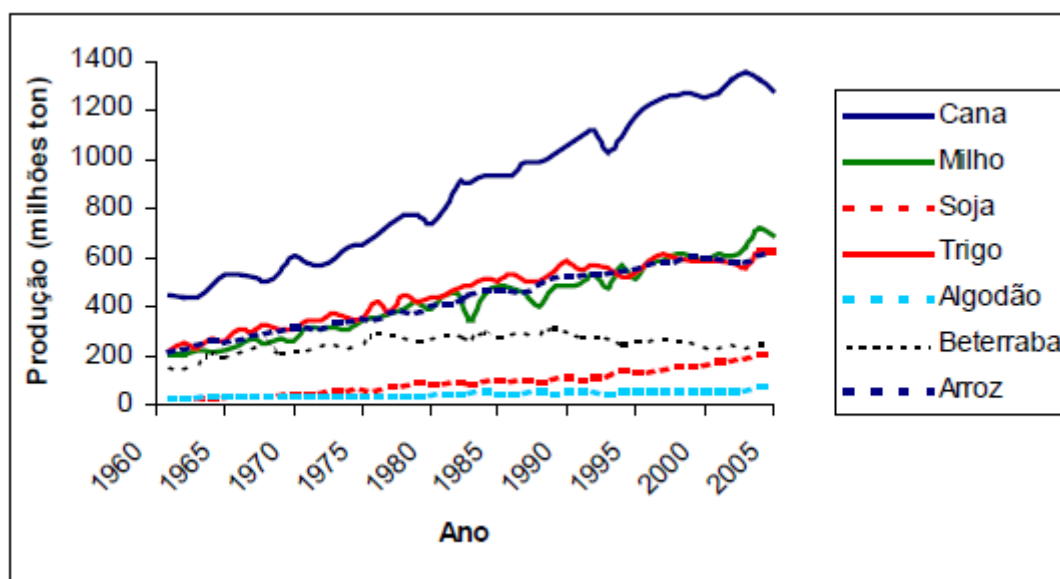


Figura 9 Série histórica de geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil (FOASTAT, 2006).

Além da utilização dos resíduos lignocelulósicos na produção de enzimas microbianas em grande escala, existe outra possibilidade promissora de utilização que é a completa conversão desses resíduos em etanol (Sakumaran, 2009; Balat, 2011, Delabona, 2011), porém seria necessário uma abundante geração de resíduos, como por exemplo o que ocorre com o bagaço de cana-de-açúcar no Brasil. Uma segunda possibilidade de utilização desses resíduos é na produção de enzimas microbianas em grande escala.

Tratando-se da participação nacional na comercialização de enzimas celulolíticas, a Figura 10 apresenta algumas informações. A Figura 10a ilustra séries históricas de importação e exportação brasileiras de preparados a base de celulasas, a partir do ano de 1996. Pode ser observado que o volume de compra e venda desses produtos foi bastante intensificado no ano de 1998. Tal fato pode ser justificado pelo lançamento de novos produtos nos segmentos de padaria, têxtil, papel e celulose e alimentação animal no ano anterior. Já no ano de 2005, o governo nacional registrou a exportação de aproximadamente 64 toneladas de preparados a base de celulasas, as quais tiveram como destino diversos países latino-americanos e os países baixos (Figura 10.b). A figura 10.c

apresenta os principais países que o Brasil importou as enzimas para utilização nas aplicações industriais.

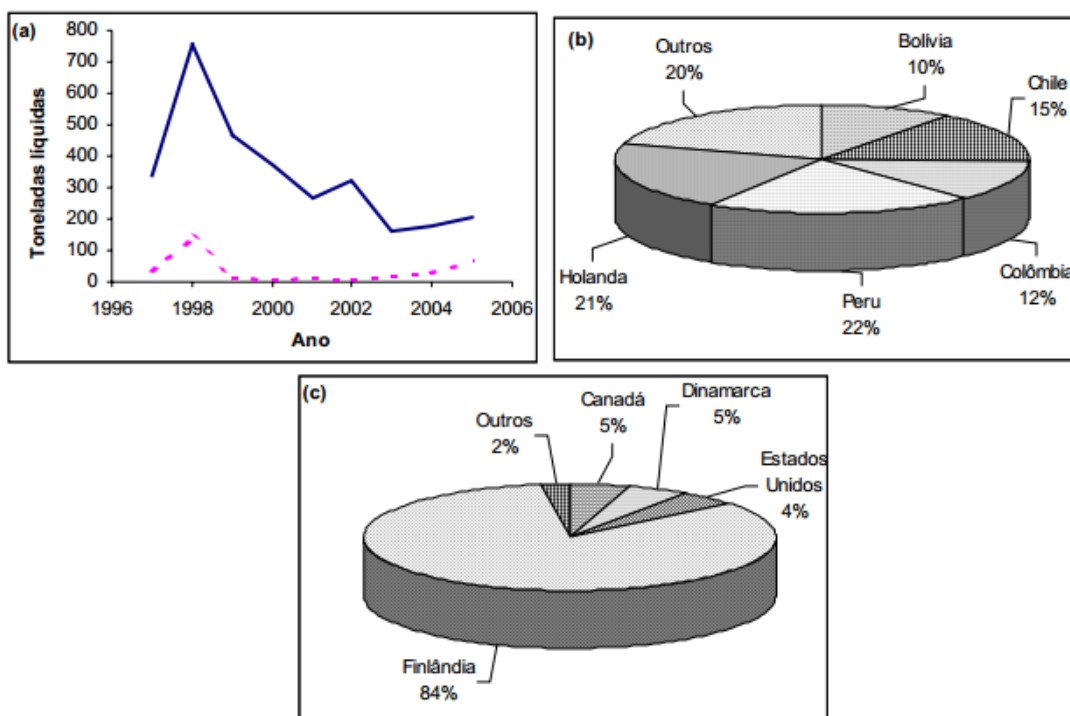


Figura 10 Comercialização de celulasas: a) Série histórica de importação (-) e exportação brasileira (--); b) Países para os quais o Brasil exportou em 2005; c) Países dos quais o Brasil importou em 2005. (ALCEWEB, 2006 in: Castro, 2006).

Os valores acima mostrados ressaltam ainda mais a importância do desenvolvimento de novas tecnologias, mais baratas, para a produção de celulasas, bem como a descoberta e o desenvolvimento (por técnicas de biologia molecular, por exemplo) de novas linhagens superprodutoras dessas enzimas.

JUSTIFICATIVA

A área cárstica escolhida para a realização dos trabalhos possui características ímpares, com uma grande diversidade de organismos troglomórficos terrestres (redução de olhos/ocelos e pigmentação) e uma gama de novas espécies a serem descritas, representando seguramente um novo hotspot de biodiversidade brasileira (Bichuette, com. pess.). Assim, o conhecimento sobre a micobiota das cavernas e, em especial desse local escolhido, é uma ferramenta de grande importância para a preservação das mesmas e da biodiversidade subterrânea. Além disso, já se sabe que ambientes extremos, como as cavernas, que possuem baixa luminosidade e concentração de carbono orgânico, possuem organismos específicos adaptados à esse local que podem possuir vias metabólicas pouco conhecidas e um grande potencial biotecnológico a ser aplicado na microbiologia ambiental em biorremediação. O isolamento, caracterização da biodiversidade e conservação da micobiota cavernícola pode levar à identificação de novas espécies, obtenção de linhagens de interesse biotecnológico, medidas preventivas contra microrganismos patogênicos ao homem em grutas turísticas e desenvolvimento de planos de manejo de grutas a serem suprimidas ou exploradas.

HIPÓTESES

Ambientes cavernícolas, por serem ambientes extremos, com condições físico-químicas específicas, são pouco explorados. Assim, nossa hipótese é que esse ecossistema apresente características singulares, em comparação com o seu entorno, e provavelmente apresente novos microrganismos a serem descritos, com rotas metabólicas alternativas, aptas para sua sobrevivência nesse ambiente, e com grande potencial biotecnológico.

OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo avaliar o papel dos fungos na ciclagem de nutrientes em ambientes cavernícolas, bem como apontar linhagens fúngicas com potencial biotecnológico para a degradação de polímeros (atividade celulolítica). Com isso contribuir para ampliar conhecimento sobre a microbiota cavernícola

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ω Realizar a caracterização físico-química do solo dos locais de coleta;
- Ω Caracterização da biomassa microbiana do solo dos locais de coleta;
- Ω Isolamento de cepas de fungos coletados em solos e rochas do ambiente cavernícola;
- Ω Descrever as linhagens isoladas;
- Ω Avaliar a produção e a atividade enzimática da endoglucanase, β -glucosidade e celulase total pelos microrganismos isolados em fermentação submersa;
- Ω Discutir a atuação funcional dos fungos e de suas enzimas extracelulares secretadas no solo;
- Ω Analisar o crescimento das cepas fúngicas, que apresentarem a melhor atividade enzimática, em substrato lignocelulósico e avaliar a produção enzimática sob fermentação em estado sólido.

MATERIAIS E MÉTODOS

VI.1 Área de estudo

O local de estudo escolhido foi o Sistema Cárstico do Rio João Rodrigues (SCJR), situado na região dos municípios de São Desidério, Catolândia, Cristópolis e Baianópolis – BA (Figura 11a), e influenciado pelo rio subterrâneo que dá nome ao sistema fluvial (Figura 11b). A caverna amostrada foi a Gruta do Catão (Lat.-12.368360, Long - 44.867630), localizada no interior da Unidade de Conservação do Parque Municipal da Lagoa Azul, situado a aproximadamente 15 quilômetros do município de São Desidério e abrangendo uma área do SCJR. O município de São Desidério, oeste da Bahia, estende-se sobre porções significativas dos calcários do Grupo Bambuí. Abrange uma área onde a cobertura vegetal natural é caracterizada por diferentes fisionomias de Cerrado com transição para mata seca e vem sendo, de forma acelerada, substituída por monoculturas irrigadas e mecanizadas ou por pastagens para sustentação da pecuária de corte.

A gruta do Catão possui duas entradas, com aproximadamente 50 m de largura por 7 m de altura, e o desenvolvimento da caverna é de aproximadamente 160 m (cerca de 15 mil m²) (Figura 12). Tem o pavimento predominantemente formado por depósitos fluviais areno-argilosos e acredita-se que nessa gruta encontra-se a primeira ressurgência do rio subterrâneo João Rodrigues. Essa caverna não apresenta uma região afótica desenvolvida, sendo que a luminosidade da zona de entrada (100-200 Lux) e da zona de penumbra (50 Lux no máximo) difere do meio epígeo (500-700 Lux).

Apresenta bom potencial ao espeleoturismo, como visitas de pequenos grupos, porém sem nenhum plano de manejo. Esta gruta abriga alta diversidade de morcegos, incluindo espécies raras e com importante função ecológica e mais de 85 espécies de



Figura 11 a) – Mapa da localização geográfica do município de São Desidério e da bacia hidrográfica do Rio São Desidério. **b)** - Mapa da localização do Sistema Cárstico João Rodrigues, eda possível rota do rio subterrâneo João Rodrigues (Sá Godinho e Pereira, 2013)

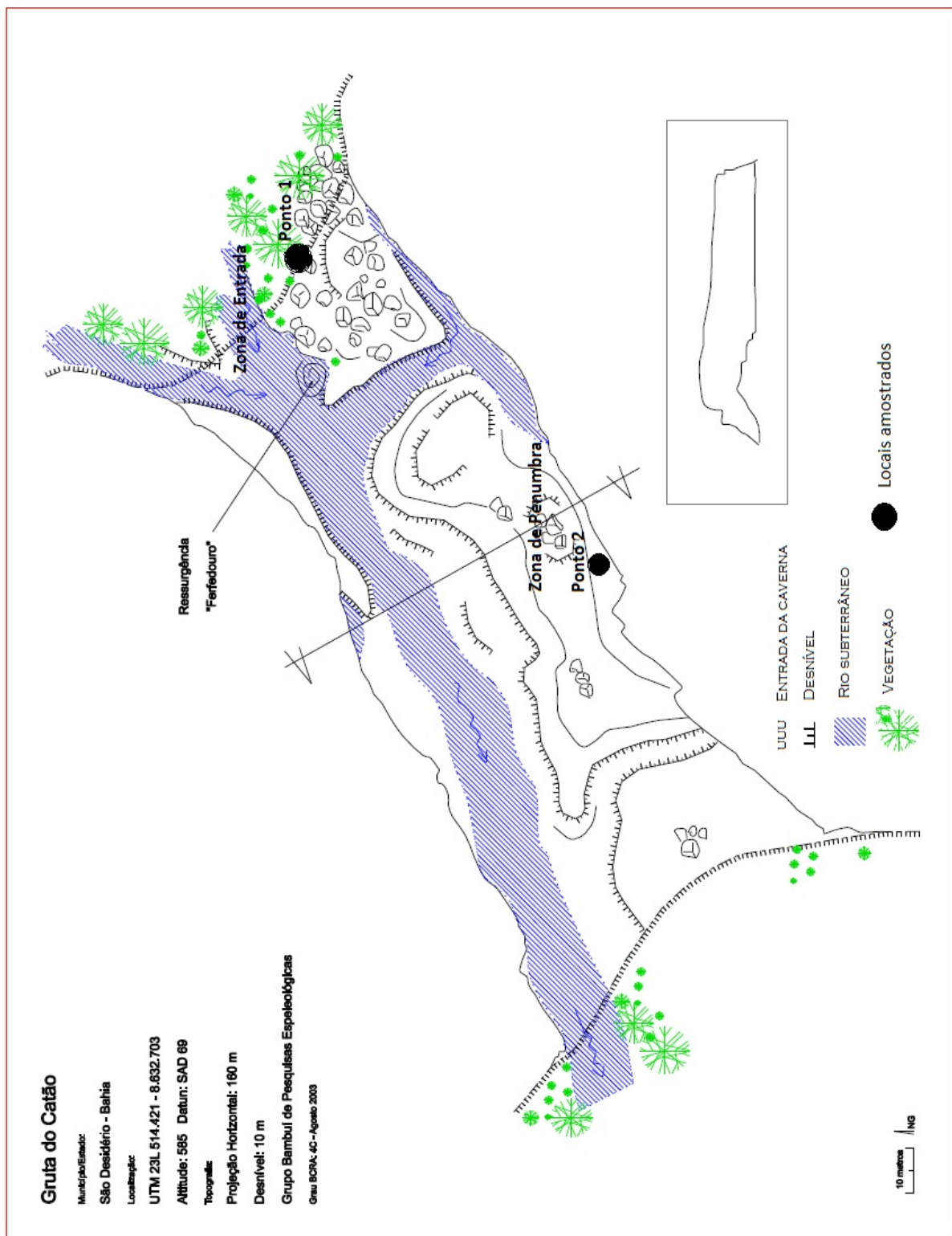


Figura 12 Planta baixa, corte transversal e escala gráfica da Gruta do Catão, destacando a zona de entrada e zona de penumbra e os pontos amostrados (●) no interior da caverna (Grupo Bambuí de Pesquisas Espeleológicas).

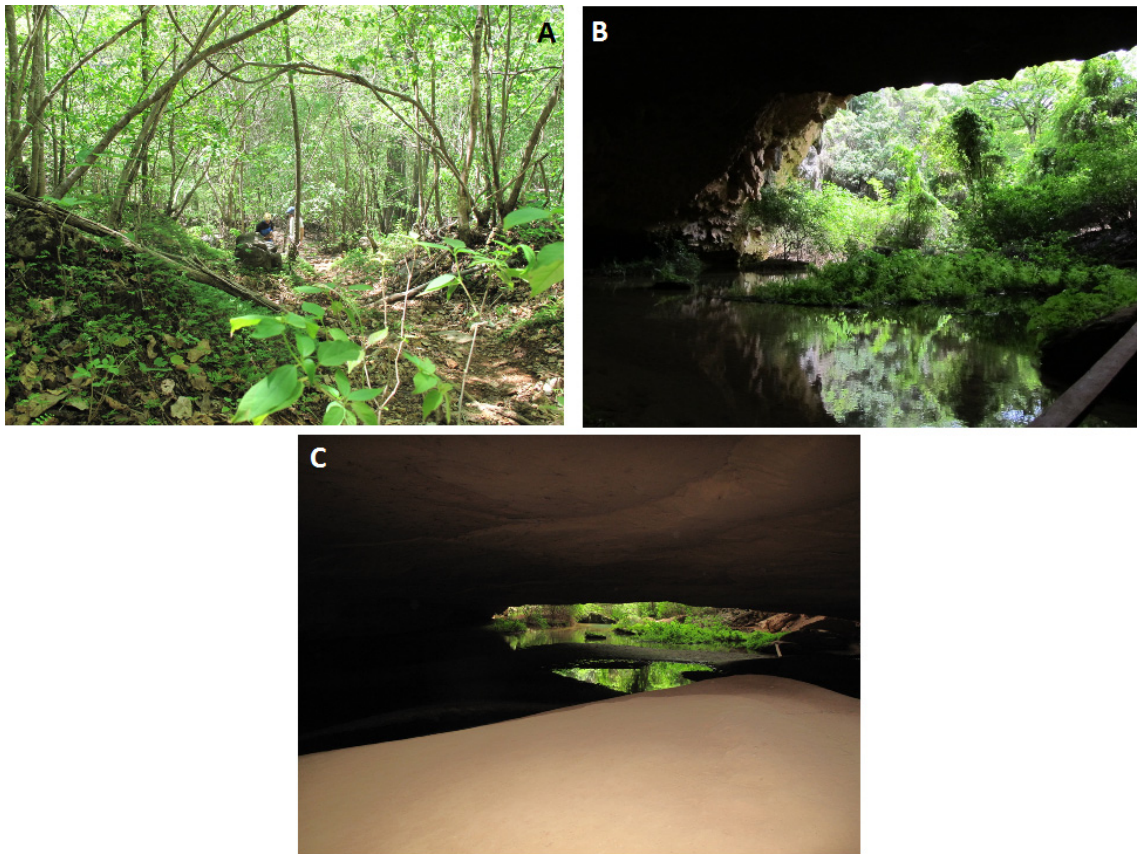


Figura 13 Imagens das áreas amostradas. A) Meio epígeo, externa à Gruta do Catão; B) Zona de entrada da Gruta do Catão; C) Zona de Penumbra da Gruta do Catão, com destaque para o banco de argila (Laboratório de Estudos Subterrâneos (LES) – UFSCar).

invertebrados terrestres (Bichuette, com. pess.). A Figura 13 apresenta algumas fotos da caverna amostrada, destacando os diferentes pontos amostrados.

A Gruta do Catão está sujeita a periódicos alagamentos, especialmente determinada pela entrada e saída das águas do rio João Rodrigues (Dantas *et al.*, 2013), porém sem uma periodicidade bem definida. Destacamos que a zona de penumbra desta caverna geralmente não sofre o processo de inundação, sendo que esse evento é mais frequente na zona de entrada da caverna. Além disso, durante os períodos de chuva, o escoamento superficial da água sobre o solo do meio epígeo pode carrear resíduos e matéria orgânica para o interior da caverna.

VI.2 Coleta das amostras

A coleta foi realizada pela equipe do Laboratório de Estudos Subterrâneos da UFSCar, coordenada pela Prof^a. Dr^a. Maria Elina Bichuette (licença ICMBio/SISBIO 10215) em Outubro/2012. Foram amostrados quadrantes de aproximadamente 0,25 m² em três pontos da caverna: um na área Epígea (ponto externo à caverna), um na Zona de Entrada (ZE – ponto 1) e um na Zona de Penumbra (ZP – ponto 2) da caverna (meio hipógeo). Nesses pontos, o solo foi coletado sempre a uma profundidade de 0 a 10 cm, com auxílio de uma pá, e armazenado em recipientes plásticos previamente esterilizados. Em cada quadrante foram coletados cerca de 300 g de solo em dois pontos distintos como mostra a Figura 14. As amostras foram transportadas para o laboratório, homogêneas e peneiradas (malhas de 2 mm) e armazenadas em geladeira a 4°C. Em seguida, cada ponto amostrado deu origem à quatro subamostras, totalizando um total de oito subamostras por quadrante (Figura 14). As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos em até 7 dias após a coleta.

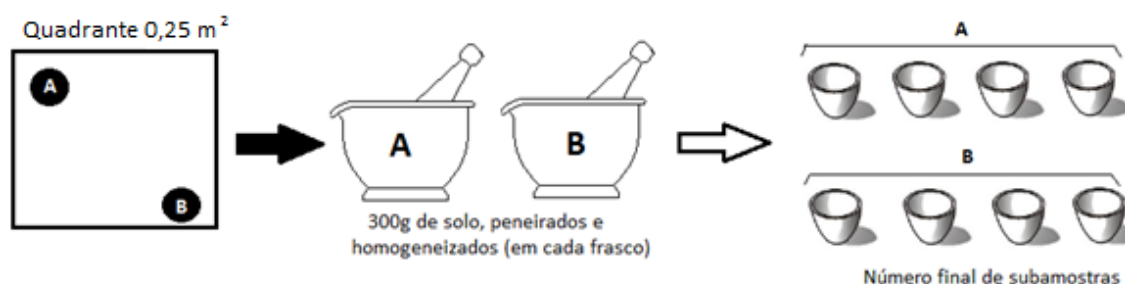


Figura 14 Desenho esquemático da amostragem realizada em cada quadrante, nos diferentes pontos amostrados.

Foram mensurados os valores de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) em cada ponto amostrado com um mínimo de intervalo de tempo entre as medições (Termohigrômetro Instruntherm THAL-300). As variáveis abióticas da água do rio João

Rodrigues como temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e sólidos totais dissolvidos (TDS) foram determinados utilizando-se o analisador de água (HORIBA U50G) equipado com sonda multifunção.

VI.3 Isolamento e Caracterização das linhagens

Para o isolamento dos fungos foi utilizado o método de diluição seriada da suspensão das amostras de solo e inoculação em meios de cultura específicos, com 3 repetições por diluição. Para 5,0g de cada amostra, aproximadamente, foram adicionados 50 mL de solução salina 0,85% como diluente, agitado a 150 rpm por 30 minutos para o preparo da suspensão. Esta sofreu diluições decimais (até 1/100.000) e inoculadas por espalhamento em superfície em meio sólido Malte 3% (acrescido do corante rosa Bengala 0,05 g.L⁻¹) e incubadas por 15 dias, à 25 °C. No sétimo e no décimo quinto dia as colônias obtidas foram (Wollum II, 1982) isoladas por estrias até a obtenção de culturas puras. Cada linhagem isolada recebeu um código SDC x.y, onde SD corresponde ao município do local de coleta (São Desidério), C corresponde à caverna amostrada (Catão), x define o ponto de coleta e y refere-se ao número da linhagem.

A fim de garantir a estabilidade genética das cepas, estas foram preservadas em refrigerador por meio da técnica de água destilada segundo Castellani (1939) e em tubos contendo ágar Malte 3% inclinado (extrato de malte 30,0g.L⁻¹, peptona de Soja 3,0g.L⁻¹, ágar 20,0g.L⁻¹, pH 5,5- 6,0). A caracterização das linhagens foi baseada nos seus morfotipos e a identificação das linhagens foi de acordo com a taxonomia tradicional, baseado nos caracteres morfológicos, até o nível de gênero. A identificação de grupos similares foi realizada por observação do aspecto da estrutura reprodutiva, esporos e hifas ao microscópio óptico e estereoscópico pela técnica de microcultivo em lamínulas, com auxílio de literatura especializada (Barnet & Hunter, 1998) e com a colaboração do Prof Dr André Rodrigues, do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, Unesp Rio Claro.

VI.4 Parâmetros químicos e biológicos do solo

a) Carbono orgânico total (COT)

Para a determinação da quantidade de carbono orgânico total do solo (COT) foi utilizado o Método Walkley & Black (1934). Cada amostra de 0,5 g de solo seco ao ar foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL, adicionando-se 10 mL da solução de $K_2Cr_2O_7$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$ e 20 mL de H_2SO_4 ; o erlenmeyer foi agitado por aproximadamente um minuto e deixado em repouso por 30 minutos. Após esse intervalo, adicionou-se 200 mL de água destilada e, após agitação de um minuto, adicionou-se 10 mL de H_3PO_4 concentrado e 10 mL da solução indicadora difenilamina. A titulação foi feita com $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Foram feitas, em paralelo, réplicas para amostras controle, sem solo. O teor de COT foi calculado da seguinte forma:

$$C \text{ orgânico (g kg}^{-1}\text{)} = [(1 - V_a / V_{bs}) (10) (0,003) (1,2987) (100)] / P_{am}$$

Onde: V_{bs} = volume de sulfato ferroso gasto na titulação do branco (mL); V_a = volume de sulfato ferroso gasto na titulação da amostra (mL); 10 = volume de dicromato adicionado (mL); 0,003 = equivalente do C (mg); 1,2987 = fator de recuperação do método; e P_{am} = peso da amostra de solo (mg).

Solução de $K_2Cr_2O_7$ $0,167 \text{ mol L}^{-1}$

Dissolver 49,025g de $K_2Cr_2O_7$ em 1000 mL de água destilada.

Solução indicadora de difenilamina

Dissolver 0,5g de difenilamina em 100 mL de H_2SO_4 . Acrescentar em seguida 20 mL de água destilada.

Solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25 mol/L

Dissolver 156,8g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, diluir vagarosamente a solução com 1500 mL de água destilada. Completar para um volume total de 2000 mL.

b) Biomassa microbiana

O carbono e nitrogênio presentes na biomassa microbiana (respectivamente CBM e NBM) foram analisados, em quadruplicatas, em amostras de solo (10,0 g) previamente ajustadas a 40% de umidade e os resultados expressos em peso seco. A umidade relativa do solo foi determinada pelo método gravimétrico, obtido após o solo apresentar um peso constante em estufa a 105 °C.

O CBM foi avaliado pelo método de fumigação-extração (Vance *et al.*, 1987), e o NBM pelo método de Brookes *et al.* (1985). Duas réplicas foram fumigadas com clorofórmio (CHCl_3) em um recipiente herméticamente fechado por 24 horas, como descrito por Vance *et al.* (1987), e as outras duas réplicas não foram fumigadas. Após esse processo foi realizado uma extração do solo (K_2SO_4 0,5M como extrator) e as concentrações de carbono nos extratos foi determinada pela oxidação com Mn^{3+} e estimada por colorimetria em espectrofotômetro (Bartlett & Ross, 1988). O conteúdo de CBM nos extratos foi calculado a partir da diferença entre as concentrações obtidas das amostras fumigadas e não-fumigadas, utilizando o fator de correção (K_{CE}) de 0,41 conforme recomendado para solos tropicais para evitar superestimar os resultados (Babujia *et al.*, 2010).

O NBM do solo foi determinado pela adição de 1,5 mL de H_2SO_4 concentrado e 50 mg de uma mistura catalisadora ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$, 10:1) a 20 mL de extrato. Após a digestão à 350°C em bloco digestor, os resíduos foram diluídos em água destilada e as

concentrações de N foram determinadas por espectrofotometria de $\text{NH}_4\text{-N}$, utilizando o método colorimétrico do indofenol azul (Feije & Anger, 1972) e o valor de 0,54 como fator de correção K_{NE} (Brookes *et al.*, 1985).

c) Densidade microbiana

A densidade de bactérias e fungos no solo foi determinada em unidades formadoras de colônias (UFC/g de solo), utilizando-se o método de diluição seriada das amostras e inoculação de suspensões diluídas de solo em meios de cultura específicos, com 3 repetições por diluição. Cerca de 5,0g de cada amostra foram adicionados a 50 mL de solução salina 0,85%, sofrendo agitação de 150 rpm durante 30 minutos seguindo de diluições em série até 1/100.000, em seguida cada diluição foi inoculada por espalhamento em superfície nos meios de cultura específicos. Os meios utilizados foram: ágar nutriente (extrato de carne 3,0 g.L⁻¹, peptona de carne 5,0 g.L⁻¹, ágar 15,0 g.L⁻¹, pH 6,8 – 7,0) para bactérias totais e meio Martin (glicose 10 g.L⁻¹, K_2HPO_4 1,0 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g.L⁻¹, peptona de soja 5,0 g.L⁻¹, rosa de bengala 0,06 g.L⁻¹, ágar 15,0 g.L⁻¹, pH 5,5- 6,0) para fungos totais, segundo Wollum II (1982). As placas inoculadas foram incubadas a 27°C e as colônias obtidas foram avaliadas após 3 dias (bactérias) e 7 dias (fungos).

VI.5 Seleção de fungos produtores de enzimas celulolíticas

Para avaliar a produção de enzimas celulolíticas, as linhagens foram cultivadas em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (CMC 10,0 g.L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10,0 mg.L⁻¹, KCl 0,5 g.L⁻¹, K_2HPO_4 1,0 g.L⁻¹, MgSO_4 0,5 g.L⁻¹, NaNO_3 3,0 g.L⁻¹, ágar 20,0 g.L⁻¹, pH 5,6 - 6,0). Os inóculos foram obtidos com a inserção de agulha de platina no centro da placa de Petri. Estas foram incubadas por 14 dias a 25 °C e ao sétimo e ao décimo quarto dia de cultivo a formação de halo de degradação foi revelada após adição de 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g.L⁻¹) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com

5mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão. Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com paquímetro (Nogueira & Cavalcanti, 1996) e foram estimados o Índice Enzimático (Ie), sendo a razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

VI.6 Produção de enzimas celulolíticas

As linhagens fúngicas que apresentaram a formação de halo de degradação em meio sintético com carboximetilcelulose foram testadas quanto à atividade enzimática por meio de fermentação submersa. Para isso foi utilizado o meio sintético adaptado de Mandels (1969) (Uréia 0,3 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 2,0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1,4 g.L⁻¹, CaCl₂.2H₂O 0,4 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,3 g.L⁻¹, extrato de levedura 0,6 g.L⁻¹, FeSO₄.7H₂O 5,0 mg.L⁻¹, MnSO₄.4H₂O 1,6 mg.L⁻¹, ZnSO₄.7H₂O 1,4 mg.L⁻¹, CoCl₂.6H₂O 2,0 mg.L⁻¹, pH 5,6). Em 50 mL de meio sintético, adicionado de 10 g L⁻¹ de glicose, foi inoculado uma suspensão de 10⁶ esporos.mL⁻¹ e mantido a 28°C com agitação (130 rpm) por três dias para a obtenção de um pré-cultivo.

Para o experimento, 700 mL de meio Mandels contendo 10g Avicel L⁻¹ foi inoculado com 10% (v/v) do pré-cultivo, incubados em um agitador 28 °C(130 rpm) por 7 dias. Diariamente uma alíquota de 7mL do cultivo foi retirada de forma estéril e centrifugado à 3000 rpm, por 20 min. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto enzimático para as análises de expressão das celulases.

VI.7 Determinação do teor protéico

O conteúdo protéico extracelular total dos extratos brutos foi determinado segundo Bradford (1976). A um tubo de ensaio, adicionamos 800 µL de amostra, 800 µL de água destilada e 400 µL de reagente Bio Rad (à base do corante *Coomassie blue* G-250). Em seguida os tubos são agitados e deixados em repouso durante 5 min. a temperatura ambiente. Após o tempo reacional, as absorvâncias das soluções foram determinadas em

espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda (λ) de 595 nm. O branco reacional continha 800 μL de água, ao invés de amostra. Cada análise foi realizada em quadruplicata.

A curva padrão que correlaciona valores de absorbância ao conteúdo protéico de soluções foi obtida utilizando-se albumina bovina sérica como padrão em concentrações na faixa de 5 a 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Cada concentração padrão foi submetida às mesmas etapas que as amostras dos extratos enzimáticos, para sua quantificação. O corante *Coomassie blue G-250* liga-se fortemente a resíduos de arginina, que possui um lado de sua molécula carregada positivamente e liga-se mais fracamente a resíduos básicos (histidina e lisina) e aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) (Mikkelsen & Cortón, 2004).

VI.8 Quantificação das atividades enzimáticas

A determinação da atividade de endoglucanase (CMCase) foi realizada PELO método modificado segundo Ghose (1987), utilizando 30 μL do extrato enzimático, 50 μL de substrato carboximetilcelulose sódica a 1%, em 20 μL tampão citrato 0,05 mol L^{-1} (pH, 5,0). A reação foi incubada a 50°C por 15 minutos, interrompida com a adição de 300 μL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e novamente incubada a 95°C por 15 minutos. O DNS confere uma cor característica para a reação, sendo a quantidade de glicose liberada determinada em espectrofotômetro (Novaspec II Visible Spectrophotometer – Pharmacia Biotech), utilizando-se comprimento de onda (λ) de 540 nm.

A atividade da β -glucosidase foi determinada segundo Voltatodio (2012), utilizando como substrato celobiose 2% preparada em tampão citrato 0,05 mol L^{-1} (pH, 5,0). A reação com 50 μL de substrato mais 50 μL do extrato enzimático, ocorreu a 50°C por 15 minutos. A reação foi interrompida em banho fervente (10 minutos a 95°C). Em seguida foi adicionado 1 mL de reagente GOD (glucose-oxidase-peroxidase – Kit Glicose Bio Liquid, Laborclin) e incubado a 37°C por 15 minutos. Neste passo também foi preparada uma amostra de glicose padrão (10 mg L^{-1}), componente do kit. A concentração

de glicose foi determinada em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda (λ) de 505nm.

Para determinar a atividade enzimática em papel de filtro (Fpase ou celulase total), foi utilizado, como substrato, discos de papel filtro (Whatman® 1) com diâmetro de 7mm. Em cada tubo de reação foi adicionado um disco, acrescido de 50 μ L de extrato enzimático e 50 μ L de solução tampão citrato 0,05 mol L⁻¹ (pH, 5,0). A reação foi incubada por 60 minutos a 50°C. Em seguida foi adicionado 300 μ L de DNS e incubado por mais 15 minutos a 95°C. Os açúcares redutores foram medidos em 540 nm de comprimento de onda (λ) utilizando um espectrofotômetro.

Para todas as atividades enzimáticas foram utilizados controles da reação colorimétrica para descontar as contribuições do extrato enzimático (branco da enzima) e do substrato (branco da reação), separadamente, dos valores de absorbância obtidos. Os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose, mediante curvareir-padrão previamente estabelecida. Uma unidade de atividade enzimática (IU) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1mmol de glicose mL⁻¹ min⁻¹ nas condições do ensaio (IU = μ mol mL⁻¹ min⁻¹). As atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica em relação ao conteúdo de proteínas nos extratos enzimáticos.

VI.9 Fermentação em Estado Sólido

As linhagens que mais se destacaram na quantificação da atividade enzimática durante a fermentação submersa foram submetidas à fermentação em estado sólido. Para a fermentação em estado sólido foi utilizado como substrato o farelo de trigo (FT) em solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), sem adição de glicose, sendo o FT a única fonte de carbono.

Esse substrato foi escolhido pois analisando diferentes estudos realizados por outros autores, verifica-se uma alta produtividade quando utilizaram o farelo de trigo (Silva *et al.*, 2005; Delabona, 2011). Esse substrato é conhecido por apresentar fonte de carbono e nitrogênio de fácil acesso, sendo considerado na literatura científica como substrato sólido ideal.

Para a determinação da umidade do substrato levou-se uma alíquota de 100g do substrato à estufa ($65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) até obter massa constante (cerca de 72 horas). A umidade inicial utilizada foi de 72% e para o cálculo da quantidade de meio líquido a ser adicionado para o ajuste da umidade, foi utilizada a equação abaixo:

$$m\text{H}_2\text{O} = ms*(x_1 - x_2) / (1 - x_2)$$

onde, $m\text{H}_2\text{O}$ é a massa de meio líquido a ser adicionando no substrato, ms é a massa do substrato seco, x_1 é a porcentagem inicial de umidade do substrato e x_2 é a porcentagem final da umidade desejada para o substrato.

A FES ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL utilizando-se 5,0 g de substrato FT comprados no comércio local, com a umidade ajustada para 72%. Os isolados escolhidos na fermentação submersa foram crescidos em tubos contendo ágar Malte 3% inclinado por sete dias. Após esse período de crescimento, os esporos foram ressuspensos em solução salina estéril (NaCl 9 g/L + Tween 80 0,1%) utilizando-se alça de platina. Uma alíquota foi retirada para a contagem de esporos em câmara de Neubauer. Para a inoculação adicionou-se o volume de suspensão de esporos na concentração de 10^7 esporos/mL ao substrato, homogeneizados em seguida com auxílio de um bastão de vidro estéril. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas, à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas sem agitação. Para fins comparativos utilizamos uma linhagem padrão conhecida por altos

valores de atividade enzimática. Essa linhagem mutante *Aspergillus niger* 3T5B8 foi cedida pela Embrapa Agroindústria de Alimentos - Rio de Janeiro/RJ.

Após o período de cultivo foram adicionados 50 mL de acetato de sódio 0,2 M pH 4,5 e os frascos foram agitados a 200 rpm (30 °C), durante 40 minutos. Para obter o extrato enzimático, o cultivo foi filtrado em bomba à vacuo utilizando-se papel Whatman nº 1 e posteriormente o filtrado foi centrifugado por 15 minutos à 10000 rpm (4°C), sendo o sobrenadante considerado o extrato bruto enzimático.

Para a quantificação da atividade enzimática de CMCase, β – glucosidade e FPAse, foram utilizados os mesmo substratos e metodologias descritas no item VI.8. Todas as quantificações enzimáticas foram realizadas em triplicatas. As atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais por grama de substrato seco (IU.g⁻¹) obtidos de acordo com equação abaixo:

$$\text{IU.g}^{-1} = (\text{enzima}) * V_{\text{tampão}} * \text{ms}^{-1}$$

onde, (enzima) corresponde à concentração enzimática (IU.mL⁻¹), $V_{\text{tampão}}$ é o volume do tampão utilizado na extração e ms corresponde à massa do substrato seco.

VI.10 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, com três repetições. As variáveis químicas biológicas foram submetidas à estatística descritivas básicas como a média aritmética, desvio e erro padrão e o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Se o W era significativo ($p < 0,05$), a hipótese de que a distribuição seria normal era rejeitada, e a comparação das médias foi realizada por testes não paramétricos. Para comparação das médias das amostras foi escolhido a análise paramétrica teste *t* para dados normais e o teste não paramétrico bicaudal U de Mann-Whitney (Wilcoxon) usado para

testar se as medianas de duas amostras independentes são diferentes, todos a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas e produção dos gráficos foi utilizado o programa PAST versão 8.2 (Hammer O, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII.1 Parâmetros químicos e biológicos do solo

Os valores de temperatura, umidade relativa do ar e do solo no meio epígeo e nos diferentes pontos de coleta na Gruta do Catão, foram determinados (Tabela V). A temperatura média no interior da caverna foi de 25,1 °C e a média da umidade relativa do ar variou entre 70,7% e 75,2% entre os pontos, sendo que o meio epígeo apresentou uma temperatura maior, 27,4°C, e uma menor umidade relativa, 64,3%. Comparando os valores obtidos para a umidade relativa do solo, observamos que as amostras coletadas no meio epígeo e na zona de entrada da caverna apresentaram maiores valores (14,5% e 10,3%, respectivamente) em relação ao solo coletado na zona de penumbra (5,71%), provavelmente devido a maior distância da ZP ao rio João Rodrigues. Essas análises demonstram que há diferenças entre as variáveis físicas avaliadas em cada ponto de coleta.

A Tabela V também apresenta as variáveis abióticas mensuradas no monitoramento da água do rio João Rodrigues *in situ* (temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e sólidos totais dissolvidos). Devemos levar em consideração as características hídricas apresentadas por esse sistema cárstico, pois ele representa uma importante entrada de matéria orgânica e mineral no ecossistema subterrâneo, influenciando inclusive a área terrestre durante os pulsos de inundação.

Tabela IIIV Parâmetros abióticos (temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos) da água do rio João Rodrigues. Temperatura e umidade relativa do ar e umidade relativa do solo nos dos diferentes pontos amostrados.

Variáveis abióticas água	Médias ± desvio padrão		
Temperatura (°C)	26,6 ± 0,04		
pH	7,4 ± 0,03		
Condutividade (mS/m)	0,515 ± 0,0008		
OD (%)	51,66 ± 7,25		
TDS (g/L)	0,32 ± 0,0005		
	Epg	ZE	ZP
Temperatura ar (°C)	27,4	25,8 ± 0,32	25,1 ± 0,75
Umidade relativa ar (%)	64,3	70,7 ± 0,55	75,2 ± 1,85
Umidade relativa solo (%)	14,5 ± 0,27	10,3 ± 0,28	5,71 ± 0,21

a) Carbono orgânico total (COT)

Os valores de COT nos pontos amostrados apresentaram valores diferentes entre si ($p \leq 0,0028$) (Figura 15), sendo que no meio epígeo foi de 2,41 gC/g de solo, em média, e as zonas de entrada e de penumbra apresentaram valores médios de 1,3 gC/g de solo e 0,49 gC/g de solo, respectivamente. Isso evidencia que a quantidade de matéria orgânica difere nos três ambientes, sendo o meio epígeo mais rico em fontes de carbono.

A entrada de carbono orgânico no ambiente subterrâneo ocorre por duas vias principais: por meio de pequenas aberturas, fendas e sumidouros de rios que permitem a entrada de folhas, madeiras e detritos de rios e solos; ou carregado junto à água de percolação das rochas, do solo da superfície e do ambiente epicárstico (Gibert, 1986, in Simon, Pipan & Culver, 2007). Além disso, devemos considerar partículas de carbono carregadas junto com animais que entram e saem do ambiente cavernícola (Graening & Brown, 2003), bem como as suas excretas e carcaças de animais mortos.

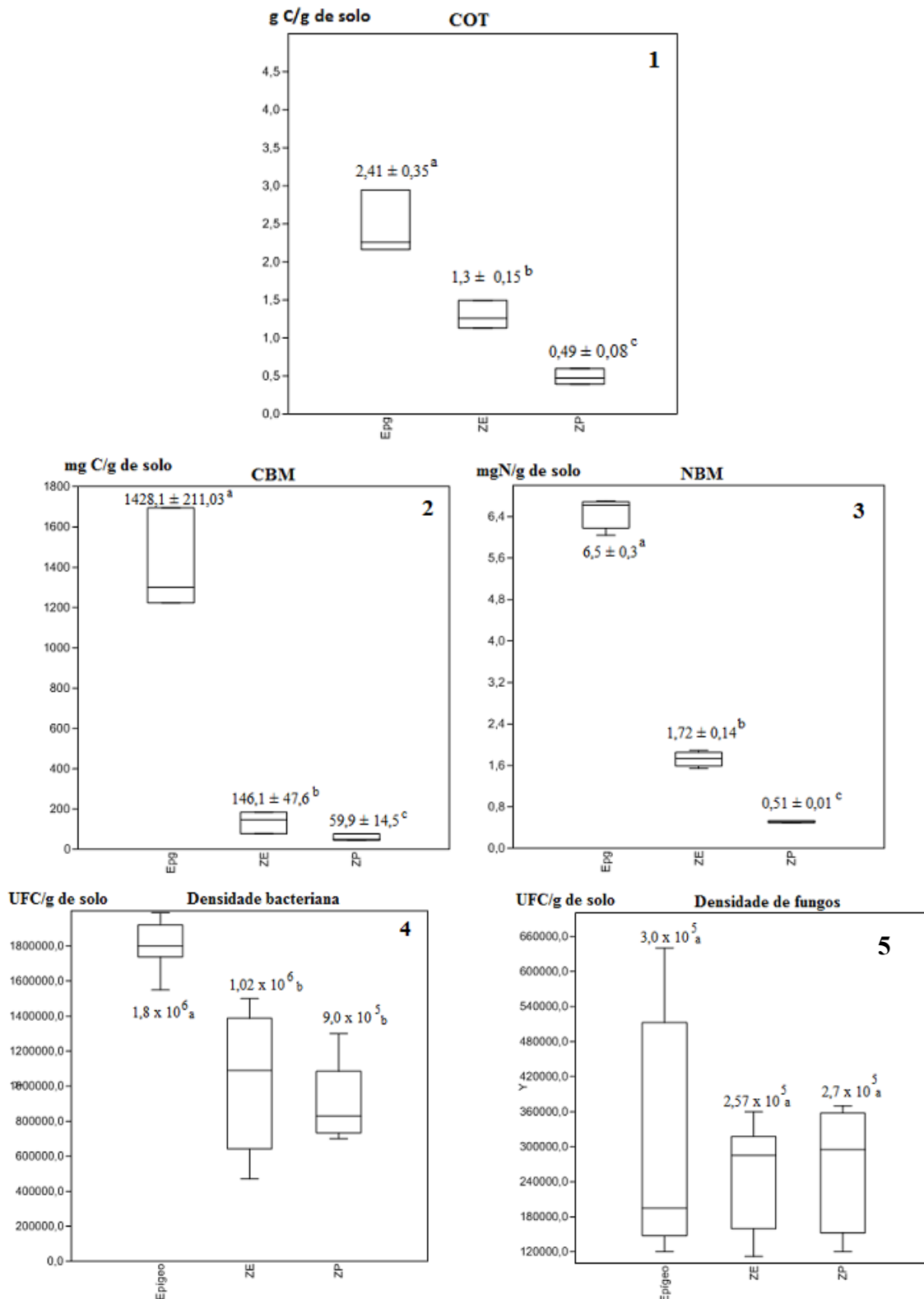


Figura 15 Variação dos parâmetros químicos e biológicos estimados para o solo da Gruta do Catão em três pontos distintos: meio epígeo, Zona de entrada (ZE) e Zona de Penumbra (ZP). Valores em destaque sobre as caixas representam as médias seguido do desvio padrão. Valores seguidos por letras iguais em cada gráfico não diferem entre si ($p < 0,05$). **1.** gC/g de solo; **2.** mgC/g de solo; **3.** mgN/g de solo; **4 e 5.** UFC/g de solo.

A presença de compostos orgânicos e inorgânicos contribui ou interfere na condutividade da água, de acordo com suas concentrações na amostra e a DBO representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana. Dessa forma, os dados referentes aos padrões físicos da água do rio João Rodrigues como a condutividade e TDS reforçam que esse sistema hídrico subterrâneo influencia na deposição de íons e matéria orgânica no ambiente subterrâneo. Esses parâmetros também nos permite inferir que a região superficial do sistema cárstico contribui a entrada de matéria orgânica e inorgânica no ambiente subterrâneo por meio da água de percolação. Por isso é fundamental a preservação e conservação da vegetação nativa das áreas de entorno de um ambiente subterrâneo, pois são áreas de influência direta no sistema cárstico e por consequência nos ambientes subterrâneos.

b) Biomassa microbiana

A quantidade de C e N da biomassa microbiana apresentou valores maiores no meio epígeo, e menores valores na ZP. A quantidade de CBM variou entre 59,9 mgC/g de solo, na ZP, a 1428,1 mgC/g de solo, no meio epígeo. Os valores médios de CBM apresentaram diferenças significativas entre os três ambientes ($p \leq 0,0001832$). A quantidade de nitrogênio da biomassa microbiana apresentou diferenças significativas entre os três ambientes amostrados ($p \leq 0,002082$), apresentando valores entre 0,51 mgN/g de solo, na ZP, a 6,5 mgN/g de solo, no meio epígeo (Figura 15).

Segundo Matsuoka, Mendes & Loureiro (2003) a diversidade florística de áreas nativas e a presença de vegetação durante todo o ano influenciam na produção e qualidade da serrapilheira, contribuindo para maiores níveis de biomassa microbiana. Feldhake (1986) verificou que o conteúdo de matéria orgânica, a atividade e a biomassa microbiana foram muito menores no solo cavernícola do que no solo de florestas em estudos realizados em quatro cavernas norte-americanas (estado de Kentucky) (Lavoie & Northup, 2005).

Apesar das cavernas serem ambientes oligotróficos, a presença de uma comunidade microbiana ativa pode fornecer material orgânico para as futuras atividades metabólicas por meio da liberação de compostos orgânicos (Gadd, 2004), liberação de elementos químicos pela dissolução mineral e ciclagem da biomassa microbiana.

Além disso, uma comunidade microbiana ativa no ambiente subterrâneo influencia diretamente a cadeia trófica: atuando diretamente na decomposição de resíduos orgânicos disponibilizando nutrientes em formas assimiláveis a outros organismos; atuando em passos limitantes no processo de decomposição, liberando enzimas extracelulares que degradam resíduos mais recalcitrantes como lignina e celulose; além de constituírem fontes de alimento importantes para alguns organismos de bases de cadeia, como protozoários e pequenos invertebrados como isópodes e colêmbolas. A taxa de decomposição de matéria orgânica no solo é influenciada pela composição da comunidade decompositora, pelas relações ecofisiológicas microbianas com as variáveis ambientais e da interação com outros organismos.

Evidências recentes em experimentos em mesocosmos de solos de florestas temperadas têm demonstrado, por exemplo, que a umidade do solo influencia o padrão de decomposição de matéria orgânica (A’Bear *et al.*, 2014), principalmente alterando a difusão do substrato, o crescimento do micélio fúngico e o metabolismo de enzimas extracelulares. Por fim, esses estudos demonstram que a supressão da comunidade de microfungos no solo pode limitar o tamanho de populações de colêmbolas (A’Bear *et al.*, 2013), interferindo diretamente na rede trófica. Ainda que o ecossistema desses estudos seja diferente de um ambiente subterrâneo, podemos assegurar que a umidade do solo interfere na comunidade microbiana no seu papel funcional, e que a supressão de alguns microrganismos altera a comunidades de organismos que se interrelacionam.

Podemos observar que a razão C/N no meio epígeo é maior do que os valores encontrados para o interior da caverna. Segundo Engel (2001), a razão entre o carbono e o nitrogênio (C: N) da biomassa microbiana em cavernas está relacionada com a qualidade nutricional e disponibilidade de nutrientes, pois quanto mais baixa for a razão, melhor será a qualidade por causa do fluxo e processamento limitado do material derivado da superfície, aumentando o teor de nitrogênio disponível.

c) Densidade microbiana

Quanto à densidade bacteriana observamos que o meio epígeo apresentou valores superiores ao encontrado no interior da caverna ($p \leq 0,001572$), entretanto, não houve diferença significativa entre valores encontrados para os pontos amostrados no interior da caverna ($p = 0,6087$) (Figura 15). Em relação à densidade fúngica não houve diferenças significativas entre os três ambientes amostrados ($p \geq 0,8074$), porém o meio epígeo apresentou um maior coeficiente de variação (CV) da sua média em relação ao ambiente subterrâneo ($CV_{Epg} = 66,9$; $CV_{ZE} = 35,2$; $CV_{ZP} = 37,4$).

A biomassa fúngica apresenta um maior teor de carbono em relação ao de nitrogênio quando comparado à biomassa bacteriana (Paul & Clark, 1996), e o fato da densidade fúngica não variar entre a ZE e ZP corroboram com os dados obtidos para C e N biomassa microbiana, com uma maior variação na quantidade de NBM em relação à CBM no interior da caverna. Entre o exterior e o interior da caverna, a diminuição da quantidade de NBM é mais expressiva e acompanha a diminuição da densidade bacteriana, e a quantidade de CBM diminui drasticamente, porém como não houve diferenças significativas entre as densidades de fungos nesses locais ocorre uma menor variação da quantidade de CBM no interior da caverna.

Foi observado que a densidade de fungos no meio epígeo apresentou uma maior variação em relação aos pontos internos à caverna (ZE e ZP). O solo é um ambiente heterogêneo constituído por um mosaico de microhabitats, e neste caso o ambiente epígeo apresenta uma vegetação nativa bem conservada. Dessa forma, a complexidade do solo e dos recursos nutritivos no meio epígeo apresenta um maior heterogeneidade de microhabitats em relação ao solo no interior da caverna, influenciando diretamente em uma maior variabilidade na densidade fúngica.

O gradiente de UFC bacterianas encontrado do meio epígeo para a ZP pode ser explicada pela ausência de luz e pela menor quantidade de nutrientes disponíveis no interior da caverna, como demonstrado pela análise de COT nesses pontos. Bahia (2007), em diferentes pontos da Gruta do Brega, MG, observou que a densidade bacteriana em guano de morcego e solo cavernícola variaram entre 3.10^5 a 1.10^7 UFC/g. Segundo Mulec (2008), a densidade bacteriana em solos nos sistemas cársticos da Eslovênia variaram de $1,3.10^3$ a $1,1.10^6$ UFC/g de solo. O mesmo padrão é observado para a densidade de fungos no nosso estudo, mesmo ela se apresentando mais homogênea ao longo da caverna. Um estudo na Caverna dos Morcegos, na Espanha, realizado por Urzi *et al.* (2010) revelou que a densidade de fungos variou entre 1.10^2 a 6.10^4 UFC/g de solo. Além disso, estudos recentes demonstram que a concentração da comunidade fúngica pode ser maior no interior da caverna do que no exterior dela, devido a maior estabilidade de temperatura e umidade, e baixa flutuação sazonal de nutrientes (Aira *et al.*, 2007; Saiz-Jimenez & Gonzales, 2007). Os fungos também podem ser a base para o desenvolvimento de uma maior atividade microbiana, pois seus exsudatos fornecem nutrientes assimiláveis para absorção pelas comunidades bacterianas, principalmente em ecossistemas terrestres (Toljander *et al.*, 2006).

Fazendo uma análise dos componentes principais das variáveis discutidas até o momento (Figura 16) observamos que a variável que se destaca das demais explicando a maior parte da variância dos dados é a densidade de fungos. O primeiro eixo explicou 76,2% da variância dos dados, e o segundo eixo explicou 16,5%. Além disso, observamos que os pontos amostrados ficaram todos agrupados de acordo com o local de coleta, mais uma vez demonstrando que existem diferenças bióticas e abióticas entre as três pontos estudados.

Considerando os pontos relacionados ao meio epígeo (Epg) na Figura 16, observamos que estes ficaram mais dispersos em relação aos demais, deixando evidente que a heterogeneidade do solo nesse local é maior do que nos outros pontos amostrados (ZE e ZP). Os pontos referentes aos dados obtidos na zona de entrada (ZE) e zona de penumbra (ZP) ficaram mais próximos entre si, sendo que os pontos da ZP ficaram mais agrupados, demonstrando uma maior uniformidade dos dados obtidos. A zona de entrada de uma caverna é uma área de transição entre dois ecossistemas distintos, possibilitando que esse local apresente uma maior variabilidade de nichos e substratos.

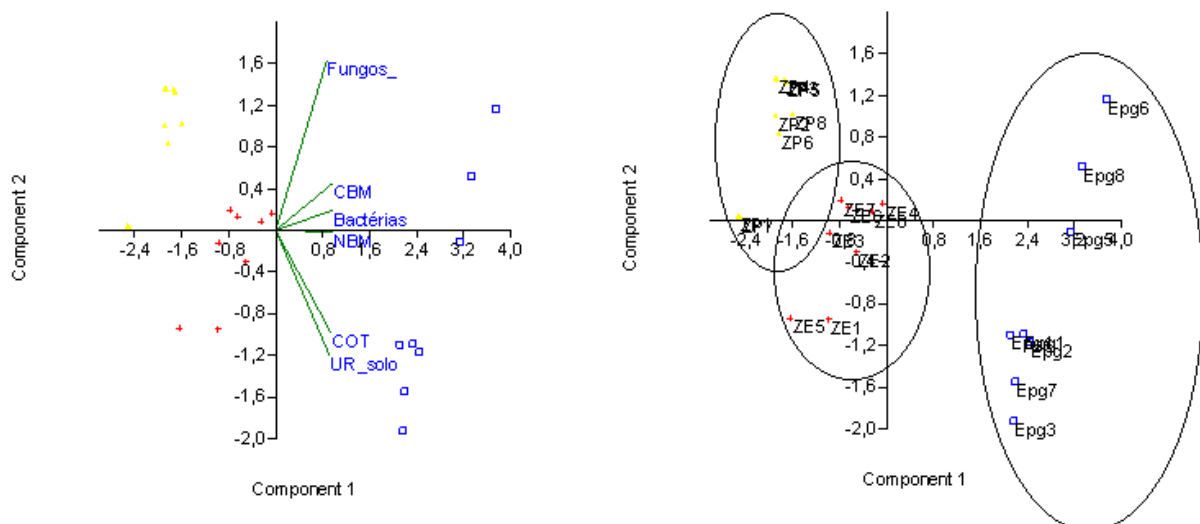


Figura 16. Análise de componentes principais destacando as variáveis que tem maior participação nas distribuições dos dados. Pontos azuis = meio epígeo, pontos vermelhos = zona de entrada e pontos amarelos = zona de penumbra.

VII.2 Isolamento e caracterização das linhagens fúngicas

No total foram isolados 20 morfotipos fúngicos, sendo que 7 foram isolados na zona de entrada da caverna (Figura 17) e 13 na zona de penumbra (Figura 18). Após a análise macro e microscópica das linhagens, identificamos que esses isolados pertencem aos seguintes gêneros: *Aspergillus* (50,0%), *Penicillium* (35,0%), *Trichoderma* (5,0%), *Purpureocillium* (5,0%) e *Scopulariopsis* (5,0%). O número de isolados de fungos foi relativamente baixo comparando com dados obtidos por outros autores estudando solo de outros ecossistemas, como Mata Atlântica e Floresta Tropical, onde observaram entre 80 – 110 linhagens isoladas (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004; Delabona, 2011). Essa redução ocorreu provavelmente devido a seleção de algumas cepas pelos seguintes motivos: 1) algumas espécies de fungos necessitarem de luz para indução à esporulação e à atividade metabólica, tornando esse fator um filtro ambiental,

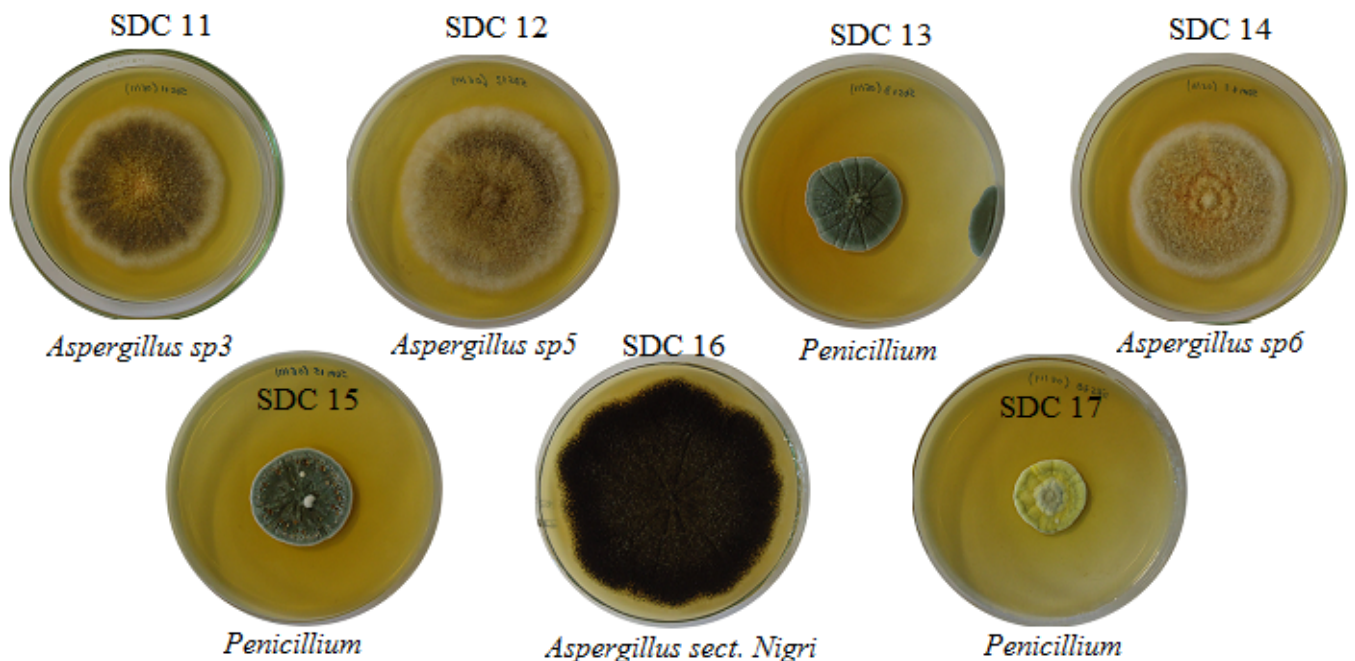


Figura 17. Fungos isolados do solo da zona de entrada da Gruta do Catão.

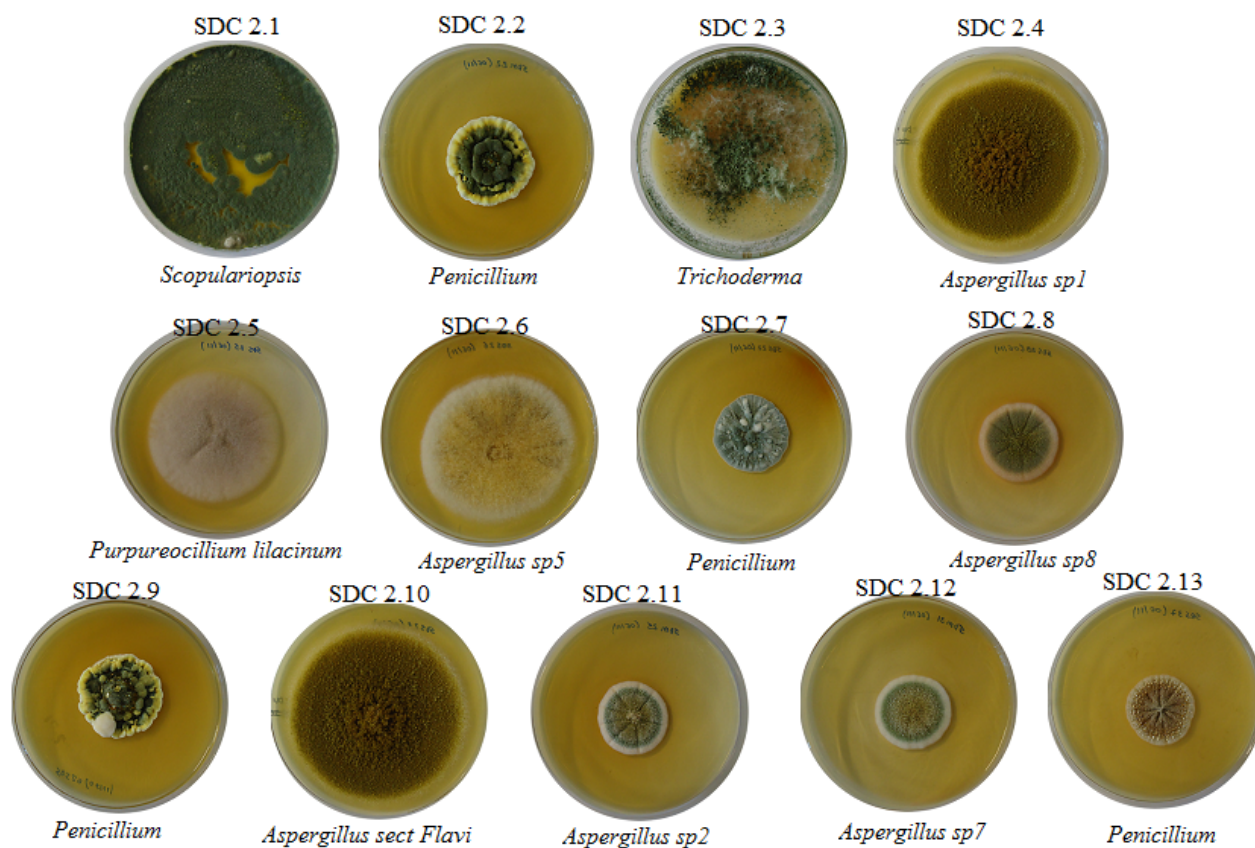


Figura 18. Fungos isolados do solo da zona de penumbra da Gruta do Catão.

2) a entrada de microrganismos por água de gotejamento e inundações periódicas do rio podem carrear organismos que não sobrevivem às condições cavernícolas e que são utilizados por fungos oportunistas como fonte de nutrientes e 3) o uso de um meio rico em nutrientes pode restringir o crescimento de fungos que são melhor adaptados às condições de ambientes oligotróficos, como Tomova *et al.* (2013) observou em seus estudos.

Deve-se ressaltar que o método de isolamento nesse trabalho foi dependente de cultivo, limitando a amostragem da comunidade micológica geral pois nessa etapa do trabalho não foi utilizado meio de cultura seletivo para fungos celulolíticos. Acredita-se que mais de 90% dos microrganismos do solo não são cultiváveis, e por fim, ainda não existe um método de amostragem e de isolamento padronizado para o estudo micológico em ambientes subterrâneos, justamente devido a singularidade de cada local.

Observamos que o número de isolados foi maior nas amostras do interior da caverna em relação à zona de entrada. Devido a limitação de luz e a menor quantidade de fontes nutritivas encontradas no interior da caverna, esperávamos que a zona de entrada apresentasse um maior número de táxons isolados devido a essa heterogeneidade. Porém, já é de conhecimento científico (Shacklette & Hasenclever, 1968; Vanderwolf *et al.*, 2013) que os períodos de inundações em cavernas podem ser considerados um controle natural para a diversidade e distribuição de fungos no solo, sendo que o ambiente subterrâneo leva 2-3 meses para recuperar uma comunidade próxima a composição original. Dessa forma como a zona de entrada na Gruta do Catão é a região que mais sofre com os pulsos de inundação, podemos considerar que esse fator provavelmente foi um fator limitante para o isolamento e cultivos de um maior número de táxons.

O gênero *Aspergillus* e *Penicillium* pertencem à ordem *Eurotiales*, Família *Trichocomaceae*. O gênero *Aspergillus* possui mais de 260 espécies e embora seja estudado desde 1729, sua sistemática está em estado de fluxo. Tanto *Aspergillus* quanto *Penicillium* são gêneros cosmopolitas, geralmente isolados do solo e resíduos vegetais em zonas tropicais e sub-tropicais. Apesar de algumas espécies produzirem micotoxinas prejudiciais à saúde humana, muitas espécies são organismos-chave atuando nos processos de decomposição no solo e na ciclagem biogeoquímica (Alexopoulos *et al.*, 1996).

O gênero *Trichoderma* inclui fungos cosmopolitas capazes de colonizar diferentes substratos e com diversas condições ambientais. Um dos mais significantes nichos ecológicos ocupados pelas espécies de *Trichoderma* é o solo. Esse gênero tem sido estudado extensivamente como fonte potencial de celulases (Voltatodio, 2012).

O fungo *Purpureocillium lilacinus* é considerado um fungo saprofítico, comumente isolado em solos, vegetação em decomposição, insetos, nematóides e vertebrados. Algumas linhagens podem causar infecções ao homem e outros vertebrados (Luangsa-ard

et al., 2011). O gênero *Scopulariopsis* é encontrado em solos de diversos ecossistemas e é conhecido por infectar unhas e quitina presente por exemplo em carapaças de insetos.

Os gêneros obtidos no presente trabalho são os mais comumente isolados em diferentes ambientes cavernícolas, como foram observados em outras cavernas brasileiras (Casirillón *et al.*, 1976, Taylor *et al.*, 2013) e no mundo (Nieves - Rivera , 2003; Ulloa *et al.*, 2006 ; Nieves – Rivera *et al.*, 2009 ; Nováková, 2009; Vanderwolf *et al.* , 2013). Taylor *et al.* (2013) obtiveram esses mesmos gêneros como os mais abundantes e em proporções semelhantes na Gruta Lapa Nova. A comparação da microbiota com outros estudos em cavernas é difícil, pois além de serem escassos, têm diferentes enfoques de estudo como a identificação de Basidiomycetos (Pedro & Bononi, 2007), isolamento de dermatófitos (Casirillón *et al.* , 1976; Silveira, 1985), resposta a drogas antifúngicas (Resende - Stoianoff *et al.* , 2012) e associação de fungos com outros invertebrados (McCarthy *et al.*, 2011).

VII.3 Seleção de fungos celulolíticos

As linhagens isoladas na zona de entrada da caverna e na zona de penumbra foram avaliadas quanto a produção de enzimas celulolíticas, cultivadas em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. A Figura 19 apresenta os índices enzimáticos obtidos após o cultivo dos fungos em meio sintético. O halo indicador da degradação de CMC, que corresponde a zona mais clara ao redor das colônias, foi observada em 18 linhagens, ou seja, 90% dos fungos estudados.

Os maiores índices enzimáticos foram superiores ou iguais à 2,4 (*Penicillium* (SDC 2.13)– 2,40 -, *Scopulariopsis* (SDC 2.1) – 2,46-, *Penicillium* (SDC 2.9)– 2,48). Todas as linhagens apresentaram um índice enzimático maior no sétimo dia de cultivo do que no 14^a dia, com exceção dos gêneros *Aspergillus sp4 (sect. Nigri)* e *Trichoderma* que não apresentaram halo de degradação em nenhuma réplica.

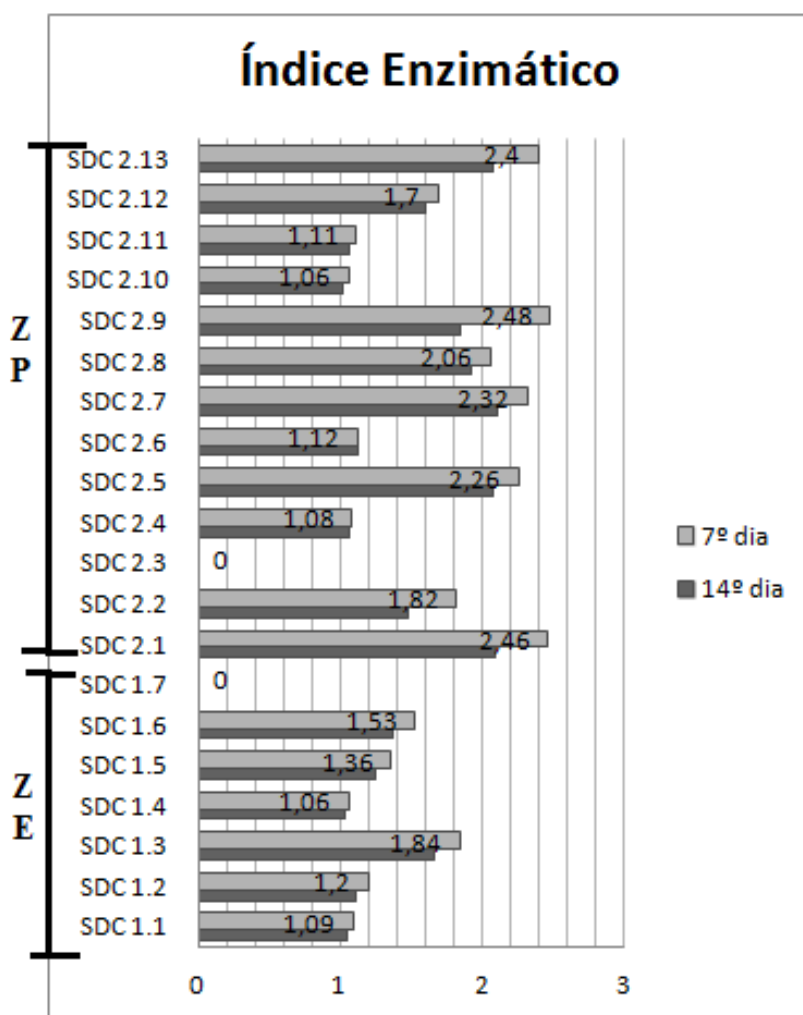


Figura 19. Índice enzimático de fungos filamentosos isolados do solo da Gruta do Catão, cultivados em meio sintético com carboximetilcelulose por 7 e 14 dias a 25 °C.

O gênero *Trichoderma* é reconhecido como um fungo produtor de celulases, entretanto, estudos comprovam que algumas espécies são influenciadas pela presença de luz para a regulação de enzimas hidrolíticas necessárias para a degradação do substrato (Schmoll *et al.*, 2005; Casas-Flores *et al.*, 2006). A visualização do halo também depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura, algumas substâncias químicas podem interferir no corante provocando sua precipitação ou inibindo a ligação deste aos polissacarídeos (Castro, 2006). O índice enzimático é adequado como uma ferramenta de seleção de linhagens produtoras, porém não é um parâmetro adequado para comparar a atividade enzimática entre diferentes linhagens.

De acordo com os resultados referentes a presença/ausência do halo de degradação no meio sintético, todas as linhagens foram submetidas à fermentação submersa para a quantificação da atividade enzimática diária. Apesar dos gêneros *Aspergillus sp4* e *Trichoderma* não terem apresentado o halo de degradação, as linhagens também foram submetidos aos testes em fermentação submersa, considerando-os como controles negativos, além de validar a triagem realizada anteriormente.

VII.4 Fermentação submersa

a) Teor protéico

Analisando o teor protéico dos extrato brutos dos isolados observamos que todas as linhagens apresentaram uma concentração de proteína secretada no meio líquido (Tabela VI). Em geral, a concentração proteica variou entre 0,02 – 0,04 mg/mL. O menor valor protéico foi de 0,017 mg/ mL nas linhagens SDC 2.2 e SDC 2.4, sendo que a linhagem SDC 2.13 apresentou a maior concentração em seu extrato enzimático (0,082 mg/mL). A secreção de proteínas no meio de cultivo demonstra a atividade metabólica das células, sendo que a secreção proteica ocorre durante o crescimento apical das hifas, liberadas pela parede celular recém-sintetizadas. Hargreaves (2008) trabalhando com bioprospecção de celulases de fungos sobre diferentes substratos concluiu que a concentração final do teor protéico depende da complexidade estrutural da fonte de carbono, atingindo maiores valores de concentração com substratos de menor complexidade (como a glicose e CMC), devido ao fato de que a glicose é prontamente metabolizada e o CMC, por causa da sua estrutura amorfa, é hidrolisado mais facilmente, liberando taxas maiores de celobiose e, em seqüência de glicose.

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, portanto são constituídas por uma parte proteica. Dessa forma, o acompanhamento da produção proteica durante o cultivo é

importante para compreender melhor a expressão enzimática dos fungos e determinar o melhor tempo de cultivo para analisar essa expressão. Caso o cultivo seja interrompido no começo há uma grande chance da enzima de interesse não ter sido produzida, ou se produzida, com baixo rendimento. Por outro lado, se for finalizado tardiamente o fungo já pode ter começado a expressar proteínas proteolíticas e comprometido todo o extrato produzido.

Tabela V. Concentração diária de proteínas (mg/mL) nos extratos brutos dos cultivos (meio de Mandels Avicel 10%, 28 °C, 130 rpm) das linhagens isoladas da Gruta do Catão.

	Código	Gênero	Concentração de proteínas (mg/mL) nos dias de cultivo						
			1	2	3	4	5	6	7
Zona de Entrada	SDC 1.1	<i>Aspergillus sp3</i>	0,029a	0,029a	0,030a	0,026a	0,030b	0,031c	0,035d
	SDC 1.2	<i>Aspergillus sp6</i>	0,037a	0,030a	0,023a	0,021a	0,021a	0,023a	0,041b
	SDC 1.3	<i>Penicillium</i>	0,045a	0,028a	0,034a	0,030a	0,030a	0,039b	0,036b
	SDC 1.4	<i>Aspergillus sp5</i>	0,028a	0,026a	0,031b	0,024a	0,024a	0,025a	0,027a
	SDC 1.5	<i>Penicillium</i>	0,030a	0,031a	0,031a	0,025a	0,028a	0,029a	0,032a
	SDC 1.6	<i>Aspergillus nigri</i>	0,020a	0,026a	0,025a	0,022b	0,021b	0,023b	0,022b
	SDC 1.7	<i>Penicillium</i>	0,031a	0,029a	0,031a	0,030a	0,040b	0,031a	0,036a
Zona de Penumbra	SDC 2.1	<i>Scopulariopsis</i>	0,032a	0,021b	0,024b	0,027b	0,018c	0,027b	0,033a
	SDC 2.2	<i>Penicillium</i>	0,028a	0,017b	0,023a	0,025a	0,019b	0,019b	0,022a
	SDC 2.3	<i>Trichoderma</i>	0,021a	0,021a	0,022a	0,023a	0,021a	0,024a	0,023a
	SDC 2.4	<i>Aspergillus sp1</i>	0,021a	0,017a	0,030b	0,025b	0,022a	0,027a	0,022c
	SDC 2.5	<i>P. lilanicus</i>	0,027a	0,021a	0,027b	0,034c	0,025a	0,027b	0,021a
	SDC 2.6	<i>Aspergillus sp5</i>	0,033a	0,024b	0,021b	0,023b	0,022b	0,021b	0,026b
	SDC 2.7	<i>Penicillium</i>	0,022a	0,018a	0,020a	0,026b	0,021a	0,027c	0,022a
	SDC 2.8	<i>Aspergillus sp8</i>	0,028a	0,024b	0,028a	0,029a	0,032a	0,031a	0,036c
	SDC 2.9	<i>Penicillium</i>	0,031a	0,022b	0,023b	0,027b	0,021c	0,024b	0,023b
	SDC 2.10	<i>Aspergillus Flavi</i>	0,032a	0,016b	0,023c	0,023c	0,021c	0,021c	0,026d
	SDC 2.11	<i>Aspergillus sp2</i>	0,030a	0,018b	0,021b	0,025c	0,019b	0,022b	0,031a
	SDC 1.12	<i>Aspergillus sp 7</i>	0,040a	0,029b	0,025b	0,031b	0,040a	0,032b	0,031b
	SDC 2.13	<i>Penicillium</i>	0,036a	0,041a	0,029b	0,031b	0,082c	0,074c	0,022d

Valores seguidos por letras iguais, na mesma linha para cada linhagem, não diferem entre si ($p>0,05$).

a) Endoglucanase

Observamos que a produção enzimática não foi constante e homogênea para todas as linhagens. Em relação à atividade das endoglucanases (CMCase), os valores de atividade enzimática variaram entre 0,01 IU/mL (SDC 2.5) e 6,39 IU/mL (SDC 1.2), linhagens do gênero *Purpureocillium* e *Aspergillus*, respectivamente. Os maiores picos de

atividade enzimática foram observados do 3º (72h) ao 6º dia (144h) de cultivo como pode ser verificado na Tabela VII. A linhagem SDC 2.8, também pertencente ao gênero *Aspergillus*, apresentou valores intermediários e com pouca variação de intensidade nos quatro primeiros dias de cultivo. As linhagens de *Trichoderma* e *Aspergillus sect nigri* não apresentaram nenhuma atividade de endoglucanase em seus extratos enzimáticos.

Tabela VI. Atividade diária de endoglucanase (IU/mL) durante o cultivo (meio de Mandels Avicel 10%, 28 °C, 130 rpm) de linhagens isoladas na zona de entrada e zona de penumbra da Gruta do Catão, BA.

	Código	Gênero	Atividade da endoglucanase (IU/mL) nos dias de cultivo						
			1	2	3	4	5	6	7
Zona de Entrada	SDC 1.1	<i>Aspergillus sp3</i>	1,16	-	-	0,4	-	-	-
	SDC 1.2	<i>Aspergillus sp6</i>	0,05	-	2,31	1,42	-	6,39	2,14
	SDC 1.3	<i>Penicillium</i>	0,69	0,35	1,83	2,83	-	1,69	1,21
	SDC 1.4	<i>Aspergillus sp5</i>	-	-	-	1,64	-	-	-
	SDC 1.5	<i>Penicillium</i>	0,45	-	3,16	0,29	1,38	3,35	-
	SDC 1.6	<i>Aspergillus nigri</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 1.7	<i>Penicillium</i>	-	-	0,06	3,17	-	-	-
Zona de Penumbra	SDC 2.1	<i>Scopulariopsis</i>	-	-	1,68	-	-	-	-
	SDC 2.2	<i>Penicillium</i>	-	0,66	-	-	-	-	-
	SDC 2.3	<i>Trichoderma</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 2.4	<i>Aspergillus sp1</i>	0,34	0,02	0,88	0,67	-	-	-
	SDC 2.5	<i>P. lilanicus</i>	-	-	-	-	-	0,33	-
	SDC 2.6	<i>Aspergillus sp5</i>	-	-	-	-	-	0,34	-
	SDC 2.7	<i>Penicillium</i>	-	0,96	1,87	-	-	-	1,70
	SDC 2.8	<i>Aspergillus sp8</i>	3,65	3,89	3,85	3,26	0,61	0,4	0,35
	SDC 2.9	<i>Penicillium</i>	-	-	-	0,03	0,60	0,21	0,16
	SDC 2.10	<i>Aspergillus Flavi</i>	1,05	-	0,75	-	-	-	-
	SDC 2.11	<i>Aspergillus sp2</i>	-	0,26	-	-	-	-	0,01
	SDC 1.12	<i>Aspergillus sp 7</i>	-	-	-	1,98	-	-	-
	SDC 2.13	<i>Penicillium</i>	-	0,12	-	0,08	-	-	0,82

Dados em negrito destacam os maiores valores de atividade enzimática.

Desde meados de 1990 diferentes espécies de *Aspergillus* têm recebido uma maior atenção e já são reconhecidas como produtoras de exo e endoglucanases e de elevadas concentrações de β -glucosidases (Vries & Visser, 2001; Castro *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Jahanger *et al.* (2005), que constataram uma melhor atividade de endoglucanase para o gênero *Aspergillus* do que para os demais gêneros estudados, como *Trichoderma* e *Penicillium*. A Tabela VIII apresenta resultados de diversos estudos que envolveram diferentes espécies de fungos em processos de

Tabela VII. Dados referentes à produção de celulasas por diversos microrganismos em diferentes condições de cultivo em processo de fermentação submersa. BG: IU/mL de β -glucosidase, EG: IU/mL de endoglucanase e FP: IU/ mL de celulase total.

Microrganismo	Substrato	Condição de cultivo:	Atividade máxima	Referência
<i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Glicose	30 °; pH 5,8	1,29 BG 0,77 BG 0,48 BG	Jager <i>et al.</i> , 2001
<i>Trichoderma. reesei</i> Rut C30	Avicel	30 °C	0,03 BG 0,54 FP	Krogh <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888			1,09 BG 0,68 FP	
<i>P. verruculosum</i> IBT 18366			0,97 BG 0,37 FP	
<i>P. pinophilum</i> IBT 10872			2,45BG 0,32 FP	
<i>P. minioluteum</i> IBT 21486		25 °C	1,70 BG 0,29 FP	
<i>Penicillium funiculosum</i>	Carboximetilcelulose	30 °C	0,44 EG 0,31 BG 0,07 FP	Castro <i>et al.</i> , 2010
	Avicel		2,70 EG 0,92 BG 0,19 FP	
<i>Aspergillus caespitosus</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Penicillium lagena</i>	Sabugo	30 °C	0,29 BG 0,87 BG 0,09 BG	Sonia <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Farelo de milho Farelo de trigo	30 °C	0,365 EG 0,153 EG	Grigorevski-Lima <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Meio sintético + peptona	30 °C	1,8 EG	Hamilton & Wase, 1991
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de mandioca	30 °C	0,12 EG	Pothiraj <i>et al.</i> , 2006
<i>Trichoderma harzianum</i> IOC-4038	Bagaço de cana –de- açucar	30 °C	0,55 EG 0,74 BG 0,09 FP	Castro <i>et al.</i> , 2010.
<i>Aspergillus terreus</i>	Avicel	Células livres	0,15 FP	Hui <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus flavus</i>		Células imobilizada s	0,13 FP	
<i>Aspergillus niger</i> ATCC – 16404	Bagaço de cana –de- açucar	30 °C	1,48 EG 4,54 BG 0,39 BG	Castro <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium sp</i>	Celulose	30 °C	0,19 EG 0,12 FP 0,04 EG 0,07 FP	Jahanger <i>et al.</i> , 2005
<i>Scopulariopsis carbonaria</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium sp.</i>	Papel filtro Watmann n° 1	28 °C	0,21 EG 0,02 FP 1,01 EG 0,018 FP 0,59 EG 0,016 FP	Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004

fermentação submersa. Na Tabela VIII também estão compilados os valores máximos obtidos em cada ensaio enzimático, para que seja feita uma melhor comparação com os resultados obtidos em nosso trabalho.

De acordo com os dados da Tabela VIII, Jargenger *et al.*, (2001), Aguiar e Lucena (2011) e Pothiraj *et al.*, (2006) obtiveram valores semelhantes aos valores obtidos em nossos resultados. Observando os resultados da atividade da endoglucanase desses estudos verificamos que apenas o trabalhos de Hamilton & Wase (1991) e Castro *et al.*(2010) apresentaram atividades de endoglucanase que se destacam dos demais autores. Hamilton & Wase, testaram duas linhagens diferentes de *A. fumigatus* quanto à produção de endoglucanases e a maior atividade de CMCase foi em torno de 1,8 IU/mL, porém usando um meio de alto custo, contendo peptona e uréia, entre outros nutrientes. No estudo realizado por Castro e colaboradores, um fungo do gênero *Penicillium* atingiu uma atividade máxima de endoglucanase de 2,7 IU/mL.

Assim podemos considerar que as duas linhagens que mais destacaram no nosso estudo apresentaram valores superiores a resultados obtidos por outros autores. Em relação as demais linhagens, estas apresentaram atividades que se assemelham aos resultados obtidos em outros estudos científicos.

b) β -glucosidase

Analisando os valores de atividade enzimática da β -glucosidase ao longo dos dias de cultivo verificamos que a sua atividade é mais constante em relação as outras enzimas analisadas. Além disso, todas as linhagens apresentaram atividade enzimática (β -glucosidases) em seu extrato bruto (Tabela IX), com exceção das linhagens do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus sect nigri*. Os menores valores de atividade β -glucosidase foram encontrados para a linhagem SDC 1.1 (*Aspergillus sp2*), que apresentou uma atividade

máxima de apenas 0,58 IU/mL. As linhagens que mais se destacaram na atividade β -glucosídica foram as linhagens SDC 1.2 (*Aspergillus sp6*) e a SDC 2.7 (*Penicillium*), que apresentaram valores máximos de 13,67 IU/mL e 11,71 IU/mL, respectivamente. Além disso, devemos destacar duas linhagens de *Penicillium* (SDC 2.2 e SDC 1.3) que, apesar de apresentarem valores de atividade enzimática menores do que as linhagens citadas anteriormente, apresentaram altos valores de atividade distribuídos uniformemente durante o período de cultivo, apresentando valores entre 1,0 a 9,0 IU/mL.

Tabela VIII VIII. Atividade da β -glucosidase (IU/mL) durante o cultivo (meio de Mandels Avicel 10%, 28 °C, 130 rpm) de linhagens isoladas na zona de entrada e zona de penumbra da Gruta do Catão, BA.

	Código	Gênero	Atividade da β -glucosidase (IU/mL) nos dias de cultivo						
			1	2	3	4	5	6	7
Zona de Entrada	SDC 1.1	<i>Aspergillus sp3</i>	-	1,16	0,35	0,32	0,22	0,58	0,41
	SDC 1.2	<i>Aspergillus sp6</i>	1,6	-	1,51	2,69	4,27	11,71	13,67
	SDC 1.3	<i>Penicillium</i>	4,78	-	0,85	3,18	4,43	1,83	2,68
	SDC 1.4	<i>Aspergillus sp5</i>	0,24	0,02	0,34	0,76	0,38	1,12	0,77
	SDC 1.5	<i>Penicillium</i>	-	1,26	2,55	2,70	2,96	3,75	4,49
	SDC 1.6	<i>Aspergillus nigri</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 1.7	<i>Penicillium</i>	-	-	0,31	0,60	0,25	0,51	0,53
Zona de Penumbra	SDC 2.1	<i>Scopulariopsis</i>	0,91	1,00	0,14	0,42	1,61	1,29	-
	SDC 2.2	<i>Penicillium</i>	2,15	5,31	4,76	8,18	4,55	4,54	3,27
	SDC 2.3	<i>Trichoderma</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 2.4	<i>Aspergillus sp1</i>	1,32	0,82	0,17	1,44	1,26	1,50	1,68
	SDC 2.5	<i>P. lilanicus</i>	-	0,02	0,80	0,47	1,11	1,36	0,87
	SDC 2.6	<i>Aspergillus sp5</i>	-	0,82	0,44	0,35	0,79	1,30	1,34
	SDC 2.7	<i>Penicillium</i>	0,49	2,82	5,57	1,43	9,20	11,71	0,49
	SDC 2.8	<i>Aspergillus sp8</i>	-	0,22	0,52	0,48	0,38	0,51	0,33
	SDC 2.9	<i>Penicillium</i>	1,13	1,61	0,24	0,27	2,67	2,48	2,83
	SDC 2.10	<i>Aspergillus Flavi</i>	0,14	2,15	0,28	0,57	3,65	5,44	0,01
	SDC 2.11	<i>Aspergillus sp2</i>	0,31	0,37	0,58	0,06	0,08	0,10	0,09
	SDC 1.12	<i>Aspergillus sp 7</i>	-	0,01	0,71	0,41	0,18	0,57	1,09
	SDC 2.13	<i>Penicillium</i>	1,00	0,39	4,24	9,02	5,01	3,71	4,64

Dados em negrito destacam os maiores valores de atividade enzimática.

Jager *et al.* (2001), compararam a produção de β -glucosidase em três espécies de *Aspergillus*, obtendo um valor máximo de apenas 4,87 IU/mL. Na literatura científica altos valores de produção e atividade de β -glucosidase são relatados para o gênero *Penicillium* (Krogh *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005). Comparando os resultados obtidos em nosso

trabalho com os dados publicados por outros autores (Tabela VIII) destacamos que as linhagens isoladas no presente estudo apresentaram valores semelhantes ou superiores de atividade da β -glucosidase, destacando-as assim como boas produtoras de enzimas celulolíticas.

O complexo de celulases de uma gama de fungos é limitada pela baixa produção de β -glucosidase, pela inibição da hidrólise por glicose e, na maioria das vezes, a β -glucosidase é inibida pelo seu próprio substrato, a celobiose (Schimid & Wandrey, 1987). Considerando isto, uma β -glucosidase que é insensível ou até mesmo tolerante a glicose e celobiose, é altamente desejada para a conversão de biomassa celulósica em glicose.

c) Celulase total

Considerando a atividade sobre o Papel Filtro (FPase) observamos que a presença de atividade enzimática também não foi diária para todas as linhagens (Tabela X). Os gêneros *Scopulariopsis* e *Purpureocillium* apresentaram baixa produção e atividade enzimática da endoglucanase e FPase em relação aos dados obtidos. As linhagens do gênero *Penicillium* apresentaram valores intermediários de atividade da FPase, sendo que duas linhagens não apresentaram nenhuma atividade enzimática em seu extrato bruto (SDC 2.9 e SDC 1.3). A ausência de atividade enzimática também foi observada nos extratos brutos das linhagens do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus sect nigri*. Por fim, as linhagens do gênero *Aspergillus* também apresentaram valores intermediários, com exceção da linhagem SDC 2.8 que apresentou atividade enzimática entre 1,07 a 1,70 IU/mL e com pouca variação enzimática ao longo do cultivo.

Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), também obtiveram valores de atividade de FPase menor do que a atividade de CMCase para os gêneros *Scopulariopsis* e *Purpureocillium*. Hui *et al.* (2010) com linhagens de *Aspergillus flavus*, verificaram que em

20 dias de cultivo a atividade enzimática máxima observada da FPAse foi semelhante aos resultados obtidos em nosso trabalho. Também podemos observar valores de atividade enzimática semelhantes nos estudos desenvolvidos por Jahanger *et al.* (2005) e Castro *et al.* (2010) para fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. A atividade enzimática das linhagens testadas no presente trabalho foi semelhante ou superior às observadas na literatura pelos autores acima citados. Porém Emtiazi *et al.* (2001) obtiveram valores de 7 IU/mL de atividade de FPAse para fungos da espécie *Aspergillus terreus* em meio suplementado com 5mM de glicose.

Tabela IIX. Atividade diária sobre Papel Filtro, FPAse (IU/mL) durante o cultivo (meio de Mandels Avicel 10%, 28 °C, 130 rpm) de linhagens isoladas na zona de entrada e zona de penumbra da Gruta do Catão, BA.

	Código	Gênero	Atividade da FPAse (IU/mL) nos dias de cultivo						
			1	2	3	4	5	6	7
Zona de Entrada	SDC 1.1	<i>Aspergillus sp3</i>	-	-	-	-	-	0,24	0,07
	SDC 1.2	<i>Aspergillus sp6</i>	0,03	0,02	0,04	-	-	-	-
	SDC 1.3	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	0,09
	SDC 1.4	<i>Aspergillus sp5</i>	-	-	-	-	-	0,04	-
	SDC 1.5	<i>Penicillium</i>	0,14	0,06	-	-	-	0,07	0,03
	SDC 1.6	<i>Aspergillus nigri</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 1.7	<i>Penicillium</i>	-	0,45	-	-	-	0,24	-
Zona de Penumbra	SDC 2.1	<i>Scopulariopsis</i>	-	-	-	-	0,12	0,25	-
	SDC 2.2	<i>Penicillium</i>	0,08	-	-	-	-	0,36	-
	SDC 2.3	<i>Trichoderma</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 2.4	<i>Aspergillus sp1</i>	-	0,48	-	-	-	-	-
	SDC 2.5	<i>P. lilanicus</i>	-	-	-	-	-	0,26	0,22
	SDC 2.6	<i>Aspergillus sp5</i>	-	-	-	-	0,82	0,65	0,18
	SDC 2.7	<i>Penicillium</i>	-	0,44	-	-	-	0,27	-
	SDC 2.8	<i>Aspergillus sp8</i>	1,43	1,7	1,23	1,07	1,32	1,14	1,12
	SDC 2.9	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	-
	SDC 2.10	<i>Aspergillus Flavi</i>	-	-	-	0,02	-	0,04	0,02
	SDC 2.11	<i>Aspergillus sp2</i>	-	-	0,03	-	-	0,07	-
	SDC 1.12	<i>Aspergillus sp 7</i>	-	-	-	-	0,24	0,41	-
	SDC 2.13	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-	-

Dados em negrito destacam os maiores valores de atividade enzimática.

O teste enzimático sobre o Papel Filtro (FPAse) é utilizado comumente como uma forma de avaliar a presença das três classes enzimáticas envolvidas no processo de hidrólise da celulose, além de avaliar a sinergia das enzimas atuantes. Os extratos que não apresentaram uma atividade de FPAse possivelmente não produziram uma das classes

enzimáticas necessárias para realizar a hidrólise completa, e quando produz todas as enzimas, a quantidade é tão baixa que a reação enzimática completa não produz uma concentração de açúcares redutores suficiente para detecção. Fungos que não apresentam atividade de FPase, mas são capazes de produzir pelo menos uma das enzimas celulolíticas não são denominados fungos celulolíticos verdadeiros. Esses microrganismos não produzem todas as enzimas necessárias para a hidrólise completa dos resíduos celulósicos, mas *in situ* eles utilizam parcialmente a celulose degradada durante o seu crescimento, se beneficiando também da ação enzimática de outros microrganismos presentes no solo que liberem as enzimas necessárias para completar a reação enzimática. Podemos considerar que mesmo as linhagens que não apresentaram atividade enzimática da FPase, mas que apresentaram resultados positivos para endoglucanase ou β -glucosidase, podem ter um papel funcional importante na ciclagem do carbono no solo, atuando em um consórcio de microrganismos, se beneficiando e acelerando o processo de hidrólise.

Fungos com baixa atividade FPase podem conter enzimas específicas com propriedades interessantes, como uma maior atividade específica ou uma menor inibição pelo seu produto, como verificado por Brown *et al.* (1987) e Krogh *et al.* (2004). Assim linhagens que apresentem baixa atividade FPase não devem ser descartadas de imediato, pois deve-se analisar o quão eficiente pode ser seu complexo enzimático e se a atividade enzimática possui uma grande variação de valores dependendo da disponibilidade de substrato no meio de cultivo.

Algumas linhagens não expressaram atividade diária de endoglucanase e β -glucosidase possivelmente pelo fato que as celulasas não possuem cinética linear em substratos poliméricos, supostamente devido à heterogeneidade de cada substrato (Zhang *et al.*,1999). Além disso, microrganismos celulolíticos geralmente são aptos a utilizar

proteínas ou lipídeos como fonte de energia para o seu crescimento e a síntese de celulase pode ser interrompida por repressão pela presença de glicose, quando a geração de glicose é mais rápida do que o próprio consumo.

Como essas linhagens fúngicas foram isoladas de um ambiente com pouca disponibilidade de nutrientes, provavelmente não requerem muita energia para o seu metabolismo. Consequentemente, a hidrólise desse biopolímero por essas linhagens deve ser mais lenta para satisfazer as necessidades metabólicas do crescimento celular e de suas funções ativas. Assim, níveis mais baixos de glicose podem inibir a produção de celulase, interrompendo a liberação de celulase no meio de cultura.

Um estudo realizado por Semikolennykh *et al.*,(2005) avaliou a comunidade microbiana e a velocidade de degradação de celulose no interior de cavernas da Rússia e no seu entorno (meio epígeo) durante 8 semanas. Uma das conclusões de seus estudos é que a velocidade de degradação da celulose no ambiente subterrâneo é menor quando comparado aos resultados obtidos no meio epígeo. Esses resultados evidenciam que o metabolismo da comunidade microbiana no ambiente subterrâneo é mais lento quando comparado a outras comunidades microbianas do solo em outros ecossistemas, que possuem um fluxo de energia mais dinâmico.

Comparando os locais amostrados quanto a atividade enzimática, percebemos que as linhagens isoladas da zona de entrada da caverna possui uma maior atividade CMCase e uma menor atividade FPAse em relação às linhagens isoladas da zona de penumbra. A zona de entrada de ambientes cavernícolas é uma região de transição entre dois ecossistemas distintos, e dessa forma possui uma heterogeneidade de fonte celulósica maior do que a que encontramos no interior da caverna. Assim, partículas maiores de matéria orgânica e uma maior competitividade por nutrientes provoca um aumento dessa

produção enzimática de CMCase, que em geral inicia a reação com a solubilização do substrato e acelerando a hidrólise celulolítica.

Sabendo que os rios subterrâneos contém carbono orgânico dissolvido, matéria orgânica particulada e biopolímeros como celulose e lignina carreados do solo da superfície externa pela água de percolação (Culver & Papan, 2009), podemos concluir que as inundações periódicas do rio subterrâneo João Rodrigues na Gruta do Catão provocam uma descarga de nutrientes no solo, inclusive de celobiose que é um dissacarídeo, produto da hidrólise incompleta da celulose. Dessa forma, uma maior quantidade de celobiose nesse ambiente possibilita uma maior produção e atividade de β -glucosidase, porém esse substrato pode também inibir a produção de endo e exoglucanases em algumas linhagens.

Microrganismos de mesmo gênero ou espécie podem expressar proteínas em quantidades maiores ou menores dependendo do seu metabolismo e da sua necessidade nutricional em seu habitat (Delabona, 2011). Muitos microrganismos requerem quantidades diferentes de carbono e nitrogênio para indução da produção das celulasas (Sakumaran *et al.*, 2009) e portanto, a análise dos dados de produção e atividade celulolítica deve ser feita considerando que os parâmetros fermentativos são fixados em laboratório e, portanto, as condições de fermentação podem não ter sido as mais adequadas para algumas linhagens.

As celulasas atuam sinergicamente para degradar a celulose cristalina. Esses sinergismos podem resultar em aumentos da atividade enzimática de até quinze vezes a mais do que qualquer atividade de uma celulase individual (Irwin *et al.*, 1993; Wilson, 2008). Analisando as linhagens que mais se destacaram (SDC 1.2 e SDC 2.8) na quantificação da atividade enzimática de CMCase, β -glucosidase e FPAse compreendemos melhor a ação sinérgica das enzimas. A linhagem SDC 2.8 (Figura 20a) apresentou grandes picos de atividade de endoglucanase, porém não apresentou muito destaque na

atividade β -glucosídica. Observando a atividade dessas duas enzimas destacamos que o pico de atividade da endoglucanase precede o pico máximo de atividade β -glucosídica, já que o substrato da β -glucosidase é o produto da ação hidrolítica da endoglucanase. Considerando a atividade da FPAse, destacamos que ela é mais intensa no início do cultivo, diminuindo sua atividade após o quarto dia de cultivo (~ 96 horas). Esse decaimento pode ter ocorrido possivelmente devido ao acúmulo de glicose no meio de cultivo, inibindo a ação das enzimas, deixando mais claro a ação conjunta entre elas.

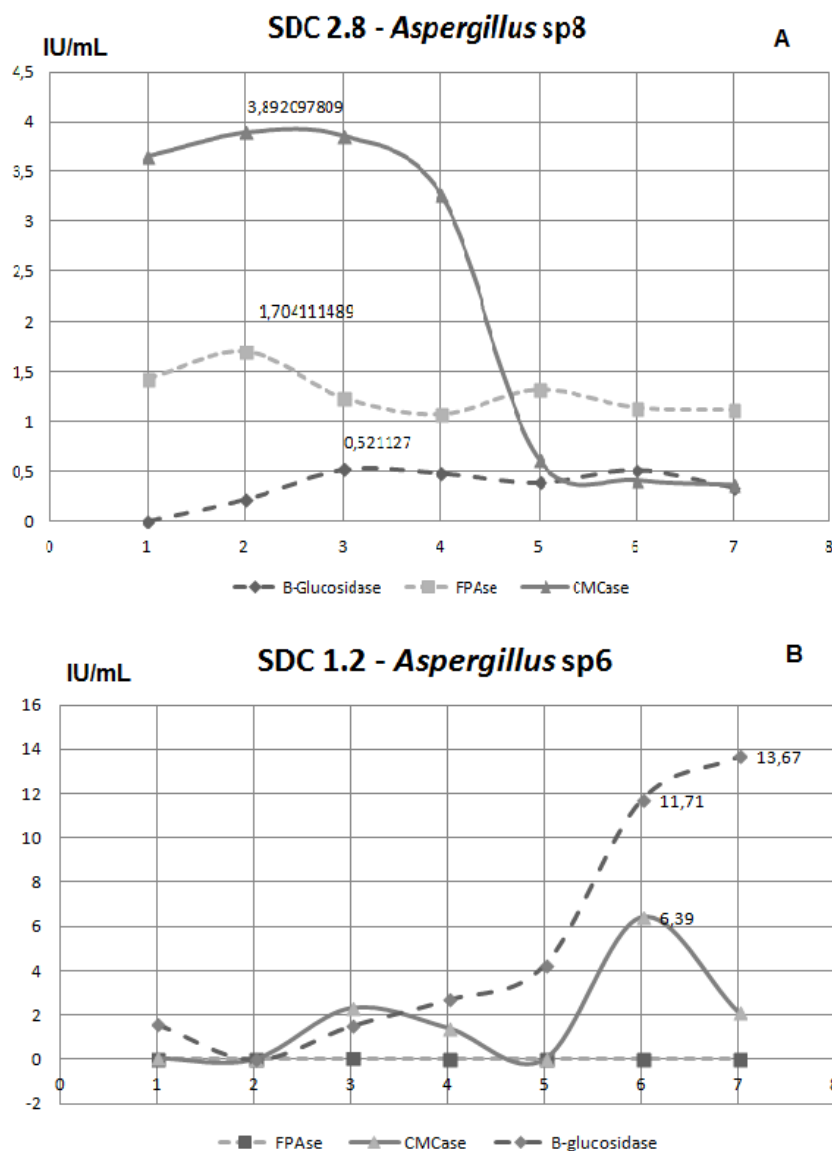


Figura 20. Atividade diária de enzimas CMCase, FPAse e B-glucosidase para a linhagem SDC 2.8 (*Aspergillus sp8*) [A] e SDC 1.2 (*Aspergillus sp6*) [B].

A Figura 20b destaca mais uma vez que a linhagem SDC 1.2 apresentou alta atividade de endoglucanase e de β -glucosidase e os maiores picos de atividade endoglucanase precedem os picos de β -glucosidase, como ocorre na linhagem SDC 2.8. Porém esses picos ocorrem no 6º e 7º dia de cultivo (144 horas e 168 horas) e a atividade de FPAse não se destacou tanto quanto a linhagem SDC 2.8. Isso provavelmente ocorreu devido a ausência, ou baixa atividade da enzima exoglucanase. Assim, mesmo com a atividade da endoglucanase ocorrendo no início do cultivo, a liberação do produto (celobiose e oligossacarídeos com GP < 7) não era o suficiente para elevar a atividade de β -glucosidase, ocorrendo após um período maior de atuação da endoglucanase e acúmulo do substrato para a β -glucosidase. Assim a falta de sinergia interfere diretamente da atividade hidrolítica total sobre a celulose.

Supõe-se que a degradação de material vegetal em ecossistemas terrestres depende de muitos microrganismos que atuam em sinergia. Um dos problemas na compreensão da degradação de resíduos celulósicos é que ainda não se sabe exatamente o substrato adequado para a maioria dos microrganismos, pois pode haver diferentes microrganismos especializados em determinadas regiões da parede celular vegetal. Um exemplo é uma cultura mista estável, contendo quatro microrganismos, que degrada a celulose, mas somente um deles pode hidrolisar a celulose, sendo que os demais possuem uma função nesse consórcio que não está diretamente ligada à hidrólise de celulose (Kato *et al*, 2008).

VII.5 Fermentação em estado sólido

A produção de enzimas celulolíticas pelos fungos em fermentação em estado sólido foram analisadas somente nas linhagens que mais se destacaram em relação à atividade enzimática durante a fermentação submersa. As linhagens SDC 1.2 e SDC 2.8 foram escolhidas pelo seus altos valores apresentados de atividade enzimática e a linhagem SDC

2.7 também foi escolhida pois apresentou valores baixos de FPAse e CMCase, mas se destacou na atividade da β -glucosidase. Essa linhagem também será considerada o controle negativo em relação a atividade da celulase total (FPAse). A Figura 21 apresenta os resultados da atividade enzimática e teor proteico dos extrato brutos obtidos após a o cultivo das linhagens em farelo de trigo. Destacamos que o processo de FES foi um teste preliminar para avaliar a atividade enzimática das linhagens selvagens sob essas condições de cultivo. Assim, as condições de temperatura e tempo de cultivo escolhidas foram estabelecidas conforme resultados obtidos previamente em estudos com a linhagem referência *Aspergillus niger 3T5B8* (Pirota *et al.*, 2013).

Analisando o teor de proteínas nos extratos enzimáticos observamos que não houve muita variação entre as linhagens testadas. A variação de concentração proteica variou de 0,38 mg/mL a 0,57 mg/mL, linhagens SDC 2.8 e linhagem *Aspergillus niger 3T5B8* respectivamente, sendo a maior concentração média proteica observada na linhagem *Aspergillus niger 3T5B8*. Estatisticamente a concentração de proteínas no extrato enzimático da linhagem *Aspergillus niger 3T5B8* apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,034$) em relação as linhagens testadas, sendo que dentre as linhagens isoladas da Gruta do Catão não houve diferença significativa entre os teores de proteínas quantificados nos extratos enzimáticos ($p \geq 0,76$). Assim as linhagens selvagens apresentaram uma menor produção proteica durante o período de cultivo.

Analisando a atividade da endoglucanase (CMCase) após o período de cultivo, observamos que a mínima e a máxima atividade enzimática dentre as réplicas variou entre 0,94 IU/g a 16,3 IU/g (linhagens SDC 2.8 e SDC 1.2 respectivamente), sendo a maior atividade média observada na linhagem SDC 1.2 (7,88 IU/g). Não houve diferença significativa entre as linhagens SDC 2.8, SDC 2.7 e *Aspergillus niger 3T5B8* ($p \geq 0,07$). No entanto quando comparamos os dados obtidos para a linhagem SDC 1.2 e *Aspergillus*

niger 3T5B8 observamos que houve diferença significativas entre as atividades médias de endoglucanase ($p = 0,042$), destacando a linhagem SDC 1.2 com uma atividade enzimática de endoglucanase maior do que a linhagem referência testada.

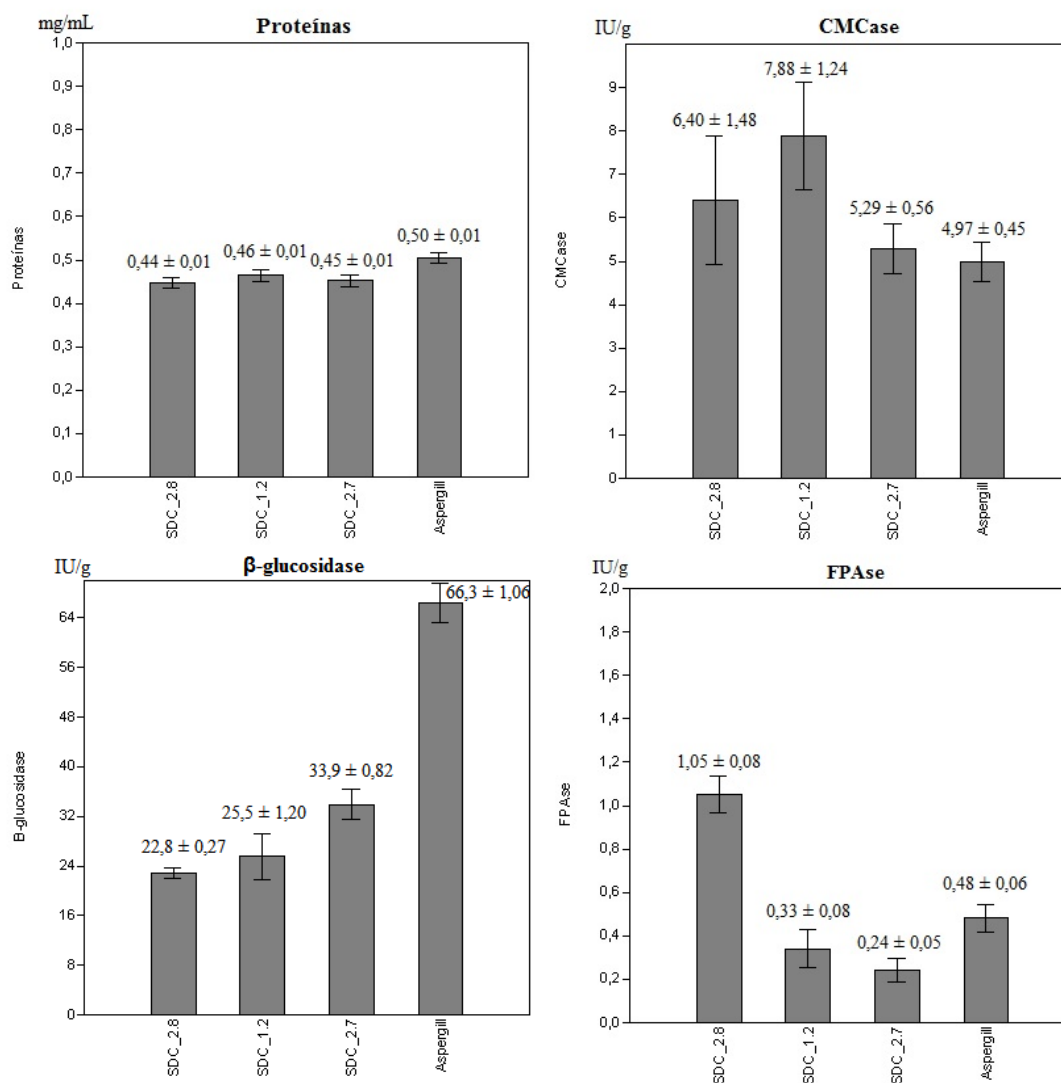


Figura 21. Teor proteico e atividades enzimáticas de endoglucanase, β -glucosidase e FPase em estratos brutos obtidos após fermentação em estado sólido com farelo de trigo. Valores em destaque sobre as caixas representam as médias seguido do desvio padrão.

Considerando a atividade da β -glucosidase observamos que a mínima e a máxima atividade enzimática entre as réplicas variaram entre 17,02 IU/g a 69,7 IU/g, referente as linhagens SDC 1.2 e *Aspergillus niger* 3T5B8. A linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8 apresentou a maior atividade média de β -glucosidase, diferindo significativamente ($p =$

0,0001) das demais linhagens, sendo que não houve diferença significativa ($p = 0,1954$) apenas entre as linhagens SDC 1.2 e SDC 2.8.

Por fim, ao analisar a atividade da celulase total (FPase) destacamos a linhagem SDC 2.8 por apresentar uma atividade média FPase de 1,05 IU/g. Os resultados obtidos para as linhagens testadas apresentam uma variação de mínima e máxima atividade de celulase total entre 0,18 IU/mL a 1,28 IU/mL, linhagens *Aspergillus niger* 3T5B8 e SDC 2.8 respectivamente. Após a análise estatística destacamos que a linhagem SDC 2.8 apresentou diferenças significativas de atividade de FPase em relação as demais linhagens, incluindo a linhagem referência *Aspergillus niger* 3T5B8 ($p = 0,001$). A atividade média de FPase da linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8 também apresentou diferenças significativas em relação à linhagem SDC 2.7, que apresentou valores menores do que linhagem padrão ($p = 0,017$).

Pirota *et al.* (2013) também avaliaram a atividade enzimática da celulase durante um processo de fermentação no estado sólido com a linhagem mutante *Aspergillus niger* 3T5B8, utilizando o mesmo substrato, porém testando diferentes condições de cultivo (umidade e temperatura). Comparando com os nossos resultados observamos que os testes realizados por esses autores apresentaram valores de atividade da celulase total entre 0,23 IU/g a 0,51 IU/g, dependendo do teor de umidade que o cultivo era submetido, enquanto que em nosso estudo a atividade enzimática dessa linhagem variou entre 0,18 IU/g a 0,58 IU/g. Considerando as condições de cultivo admitidas para o processo de FES no nosso trabalho (72% de umidade, 30° C), esses autores obtiveram uma atividade de FPase de $0,44 \pm 0,02$ IU/g, um valor próximo ao que obtivemos quando analisamos a atividade de FPase para essa linhagem. Assim, podemos considerar que a linhagem selvagem SDC 2.8 se destaca em relação à linhagem referência, sendo que as outras linhagens apresentaram valores próximos ou semelhantes à linhagem de referência. Em relação a atividade β -glucosídica, observamos que Pirota e colaboradores (2013) obtiveram em seu estudo

valores semelhantes aos dados obtidos em nosso trabalho, em que a linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8 apresentou uma atividade enzimática entre 52,0 IU/g a 72,5 IU/g.

Considerando a atividade da endoglucanase observamos que os dados obtidos por Pirota *et al.* (2013) para a linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8 apresentou uma atividade enzimática 50 vezes maior quando comparados aos valores obtidos em nosso trabalho. No trabalho desenvolvido por eles a atividade enzimática de endoglucanase sobre as mesmas condições de cultivo foi de 201,4 IU/g. Essa diferença na expressão dos valores em cada trabalho não permite uma comparação entre os nossos resultados com os de outros estudos. Essa dissimilaridade ocorre devido a grande variedade de microrganismos utilizados no processo de FES, das diferentes condições de cultivo e maneiras de expressar a atividade enzimática, além da diferença entre os equipamentos utilizados pelos laboratórios, originando um amplo intervalo de valores na literatura (Pavarina, 1997).

Afim de testar a reprodutibilidade de nossos resultados, todos os testes de atividades enzimáticas (CMCase, β -glucosidase e FPAse) foram refeitos para as linhagens SDC 1.2, SDC 2.7, SDC 2.8 e *Aspergillus niger* 3T5B8, utilizando os extratos enzimáticos obtidos da FES e que estavam congelados em freezer. Utilizando a mesma metodologia e as mesmas proporções entre extrato enzimático e substrato, observamos que o mesmo padrão foi obtido ao fim da análise dos dados, validando a reprodutibilidade dos resultados.

Assim, podemos destacar que algumas das diferenças notáveis do nosso estudo em relação ao trabalho desenvolvido por Pirota *et al.* (2013) é o tempo reacional ao quantificar as atividades enzimáticas no extrato bruto e a proporção estabelecida entre concentração de extrato enzimático e substrato. No presente estudo nossas análises foram realizadas em microensaios, utilizando um volume menor de extrato enzimático e substrato específico. Além disso, no estudo realizado por Pirota e colaboradores, o meio de cultivo utilizado para o ajuste de umidade foi o meio de Mandels, que apresenta uma maior concentração de

nutrientes na sua formulação. Segundo Rodriguez-Zuniga *et al.* (2011) as diversas fontes de nitrogênio orgânico (uréia, peptona e extrato de levedura) presentes no meio de Mandels intensificam a atividade de enzimas celulolíticas.

Alguns resultados de artigos publicados mostraram semelhanças aos dados obtidos no presente trabalho. No estudo realizado por Rodriguez-Zuniga *et al.* (2011) uma linhagem de *Aspergillus niger* submetida à fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, apresentou atividades enzimáticas de 0,4 IU/g e 13,0 IU/g de FPAse e endoglucanase respectivamente em 72 horas de cultivo. Em outro estudo realizado por Chandra *et al.* (2007) foi avaliada a atividade enzimática de um *Aspergillus niger* em diferentes substratos. A atividade máxima de FPAse e endoglucanase em farelo de trigo foi de 2,9 IU/g (em 72 horas de cultivo) e 3.24 IU/g, e a atividade β -glucosídica não ultrapassou 0,014 IU/g de substrato. Por fim, Basso *et al.* (2010) publicou um trabalho em que diferentes fungos, dentre eles *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium verruculosum* e duas linhagens padrões de *Trichoderma*, foram submetidos ao processo de fermentação no estado sólido em bagaço de cana-de açúcar. A atividade máxima de endoglucanase e celulase total foi observada para o fungo *Trichoderma reesei* QM9414, sendo que todas as outras linhagens apresentaram valores de atividade de CMCase e FPAse inferiores a 8,0 IU/g e 4,0 IU/g.

Comparando os nossos resultados com os dados da literatura observamos que as linhagens testadas no processo de FES se destacam em relação aos resultados obtidos pelos autores citados (Chandra *et al.*, 2007, Basso *et al.*, 2010, Rodriguez-Zuniga *et al.*, 2011). Essas linhagens nativas do ambiente subterrâneo se destacam pelo maior valor de atividade enzimática e também por apresentar valores elevados em apenas 48 horas de cultivo, o que é interessante para fins comerciais quanto à produção de celulases, em comparação ao tempo de cultivo de outros fungos celulolíticos. Um melhor estudo a fim de otimizar a

produção enzimática poderia melhorar o processo de fermentação, tornando essas linhagens de grande interesse para a indústria biotecnológica. Em um âmbito ecológico, a bioprospecção de enzimas celulolíticas de linhagens selvagens possibilita a utilização da biomassa lignocelulósica que se acumula todos os anos dos resíduos agroindustriais e elimina a utilização de linhagens mutantes nos processos fermentativos.

Observando a concentração de açúcares redutores nos extratos brutos de cada linhagem após a FES (Figura 22), verificamos que a linhagem padrão *Aspergillus niger* 3T5B8 foi a que apresentou uma maior concentração média de açúcar no extrato enzimático (3,0 g/L) em relação as demais. Esse resultado já é esperado considerando que a linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8 apresentou maiores valores de atividade de β -glucosidase, enzima que completa a hidrólise enzimática.

Compilando os dados, verificamos que as linhagens isoladas de um ambiente subterrâneo apresentaram uma concentração proteica semelhante à linhagem padrão, uma menor concentração de glicose no extrato enzimático e uma maior atividade enzimática em FES. Esses dados podem indicar que a eficiência das enzimas celulolíticas produzidas por esses fungos selvagens é maior, já que com uma concentração proteica semelhante entre os isolados verificamos diferenças na atividade enzimática. Esse fato pode ser explicado pelas condições oligotróficas do ambiente de origem dessas linhagens. Com um número de fontes celulósicas mais reduzidas, provavelmente esses microrganismos são selecionados no ambiente subterrâneo por apresentarem aparatos enzimáticos mais eficientes, afim de produzirem uma menor quantidade de material extracelular e uma economia de energia no processo de síntese enzimática, resultando em uma maior eficiência na competição por nutrientes.

Podemos inferir também que a taxa metabólica dos fungos nativos do ambiente subterrâneo provavelmente é menor, pois após um mesmo período de cultivo essas linhagens apresentaram uma menor concentração de glicose no extrato bruto e uma menor

atividade enzimática da β -glucosidase em relação a linhagem *Aspergillus niger* 3T5B8. Sabemos que a o fungo secreta enzimas no meio extracelular até ser inibido pela alta concentração do produto da hidrólise celulolítica. Assim, se há concentrações menores de glicose no extrato bruto isso indica que há uma menor necessidade energética para suas atividades funcionais.

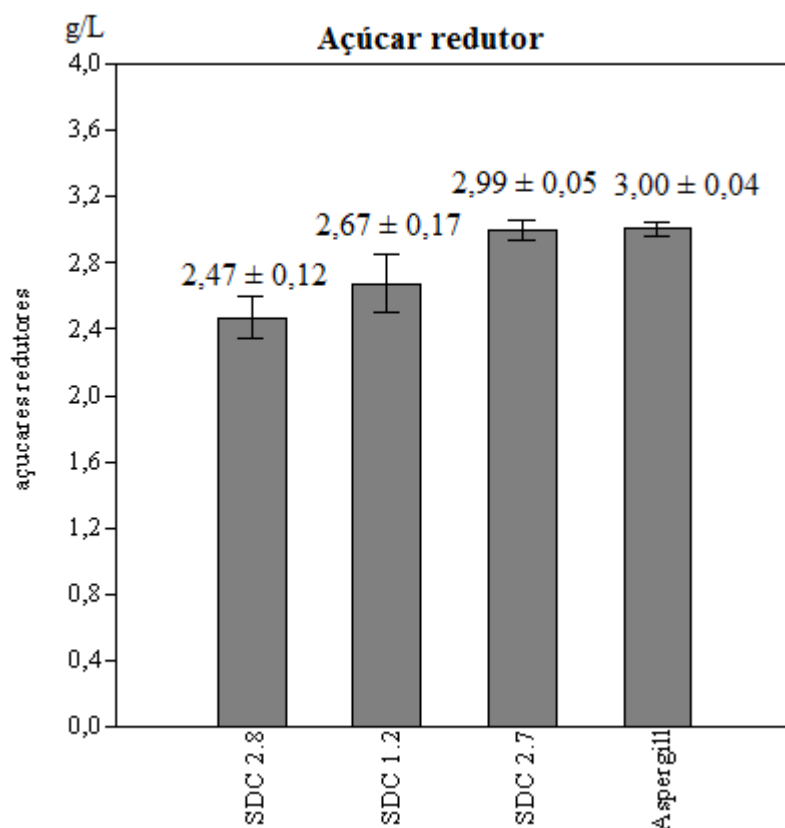


Figura 22. Concentração de açúcares redutores nos extratos enzimáticos após 48 horas de cultivo em farelo de trigo.

Considerações finais

Apesar do solo ser um ambiente heterogêneo, descontínuo e apresentar uma gama de diversidade microbiana atuando em diferentes funções ecológicas, os resultados desse trabalho indicam que os microrganismos isolados em ambientes subterrâneos são aptos em produzir enzimas que hidrolisam a celulose. Assim, podemos inferir que a hidrólise celulolítica pode ser uma das vias de entrada de energia e de carbono no ecossistema

subterrâneo. Devido às diferenças entre os experimentos que são realizados em laboratório seguindo uma forma padrão e a real atividade enzimática que ocorre no solo *in situ*, não podemos determinar qual, ou quais, organismos especificamente atuam no processo de degradação da celulose, pois os experimentos são realizados com cultivos individuais e no ambiente natural nós encontramos uma diversidade de microrganismos atuando sobre um mesmo substrato. Para uma melhor compreensão da atuação microbiana no solo de ambientes subterrâneos, seria necessário estudo em micro e mesocosmos, reproduzindo características semelhantes do substrato do local natural e das variáveis abióticas e inoculando o solo com microrganismos já isolados desse ambiente, formando um consórcio microbiano. Assim poderíamos analisar o fluxo de carbono e de energia entre os grupos microbianos, obtendo resultados mais próximos do ambiente *in natura*.

Um acompanhamento da composição e distribuição da comunidade de fungos durante um ciclo hidrológico em diferentes cavidades de uma área cárstica poderia nos orientar sobre alguns padrões de distribuições dessa comunidade e a influência dos períodos de cheias e de secas dos rios subterrâneos na diversidade micológica e funcional da microbiota edáfica. Esse procedimento também seria importante para estipular as variações na abundância de fungos durante os períodos com maior fluxo turístico e se essa atividade interfere negativamente na biodiversidade cavernícola. No mais, é necessário realizar estudos em cavidades de diferentes litologias no nosso país, possibilitando uma melhor avaliação dos processos ecológicos e da manutenção desses ecossistemas e permitindo uma melhor comparação entre cada ambiente, tornando mais robusta uma avaliação da relevância de cada cavidade.

Para estudar microbiologia de caverna é de importância crucial preservar esse ambiente em seu estado natural, para evitar a introdução de microbiota externa e de matéria orgânica alóctone. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a

microbiologia cavernícola oferece um imenso potencial para estudar as relações evolutivas ou a utilização de fontes alternativas de energia desenvolvidas por microrganismos para a absorção e eliminação de nutrientes escassos em ambientes oligotróficos. Segundo Mulec (2008) esses ambientes também podem dar respostas dos limites nutricionais e nos ajudam a identificar assinaturas geoquímicas da vida. Além disso, após submetermos as linhagens isoladas desse ambiente aos processos de fermentação submersa e fermentação em estado sólido, destacamos que o ambiente subterrâneo é um ecossistema que pode conter uma gama de variedade de microrganismos que poderiam ser de interesse biotecnológico e que poderiam ser aplicados em microbiologia ambiental.

CONCLUSÃO

Observamos que o ambiente subterrâneo apresenta diferenças entre parâmetros químicos e biológicos quando comparado ao meio epígeo. Essas diferenças no ambiente subterrâneo proporcionam nichos especializados para os organismos e condições singulares para a comunidade microbiana.

Constatamos uma diversidade micológica no solo cavernícola com uma gama de gêneros que comumente são isolados nesse ecossistema. Entretanto, 90% das linhagens apresentaram atividade celulolítica, indicando que esse ambiente favorece o desenvolvimento e propagação de microrganismos que possuem mecanismos alternativos e mais complexos para obtenção de energia e nutrientes como, por exemplo, a hidrólise celulolítica. Essa alta proporção de fungos celulolíticos isolados sugere que os mesmos são organismos importantes que atuam na ciclagem de nutrientes, contribuindo para a qualidade e a manutenção do ecossistema cavernícola.

As linhagens testadas durante a fermentação submersa se destacaram na atividade endoglucanase, β -glucosidase e celulase total. Dentre todas as linhagens, um maior enfoque deve ser dado à linhagem SDC 1.2 (*Aspergillus sp6*), por altos valores de atividade endoglucanase e β -glucosidase, e a linhagem SDC 2.8 (*Aspergillus sp8*), pela alta atividade endoglucanase e celulase total, e por apresentar de forma mais clara o sinergismo entre as três enzimas avaliadas.

Considerando a fermentação no estado sólido, concluímos que as linhagens SDC 1.2 e SDC 2.8 se destacando na atividade de endoglucanase e celulase total quando comparadas à linhagem padrão. Além disso, a linhagem SDC 2.7 se destacou mais uma vez em relação à atividade β -glucosídica, quando comparada às linhagens selvagens. Observamos que com uma concentração proteica menor do que a linhagem padrão e uma atividade enzimática mais elevada essas linhagens podem possuir um complexo enzimático mais eficiente, podendo ser utilizadas em processos de bioprospecção de enzimas celulolíticas.

A densidade, riqueza e atividade enzimática de fungos ao longo de uma caverna mostra a importância de um acompanhamento microbiano periódico, antes e após os períodos de inundação. Futuros planos de manejos deverão incluir estudos microbiológicos mais detalhados, para entender melhor as relações entre a microbiota cavernícola e o seu ecossistema e assim permitir uma melhor gestão de parques e unidades de conservação, principalmente quando nos referimos ao tamanho de grupos de turistas e suas rotas. Esforços devem ser feitos para que as diversas áreas envolvidas em um plano de gestão atuem em conjunto a fim de diminuir o risco de perturbação do solo em cavernas e minimizar a dispersão de esporos pelas atividades turísticas, causando o mínimo de impacto na comunidade nativa.

REFERÊNCIAS

A'Bear A D, Boddy L, Jones T H (2013) Bottom-up determination of soil collembola diversity and population dynamics in response to interactive climatic factors. **Oecologia**, 173(3):1083-1087.

A'Bear A D, Jones T H, Kandeler E, Boddy L (2014) Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity. **Soil Biology and Biochemistry**, 70:151-158.

Aguiar C M, Lucena S L (2011) Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology**, 33(4): 385-391.

Aira M J, Jato V, Stchigel A M, Rodríguez-Rajo F J, Piontelli E (2007) Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain). **Internacional Biodeterioration and Biodegradation** 60:231-7.

Alexopoulos C J, Mims C W, Blackwell M (1996) Introductory mycology, 4 ed. John Wiley & Sons Inc. 869 p.

Arantes C M, Saddler J N (2011) Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, 4(1):1-17.

Auria R, Morales M, Villegas E, Revah S (1993). Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. **Biotechnology and bioengineering**, 41(11):1007-1013.

Bahia G R (2007) Sucessão ecológica em guano de morcegos insetívoros em cavernas. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG.

Barbujia L C, Hungria M, Franchini J C, Brookes P C (2010) Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology & Biochemistry** 42:2174-2181.

Bartlett R J, Ross D N (1988) Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal** 52:1191-1192.

Barnett H L, Hunter B B (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. 4. ed. St. Paul, MN. **American Phytopathological Society** Press, 218p.

Basso T P, Gallo C R, Basso L C (2010) Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(11):1282-1289.

Beguin P (1990) Molecular-biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, 44:219-248.

Bhat M K (2000) Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18: 355-383.

Bhat M K, Bhat S (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, 15(4):583-620.

Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:255-260.

Brookes P C, Landman A, Pruden G, Jenkinson D S (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, 17:837-842.

Brown J A, Falconer D J, Wood T M (1987), Isolation and properties of mutant of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and B-glicosidase production. **Enzyme and Microbial Technology**, 9:169–175.

Burke J D, Michael A B, Weintraub N, Charlotte C, Hewins R (2011) Relationship between soil enzyme activities, nutrient cycling and soil fungal communities in a northern hardwood forest. **Soil Biology and Biochemistry** 43(4):795-803.

Buscot F (2005) What are soil? **Microrganisms in soils: role in genesis and functions**. Heidelberg, 3-18.

Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Rosales-Saavedra T, Martinez- Hernandez P, Olmedo-Monfil V, Herrera-Estrella A (2006) Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. **Eukaryot Cell**, 5:499–506

Casirillón A L, Moraes M A P, Furtado M S S (1976) Isolamento de *Microsporium amazonicum* do solo do estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, 6 (4):487-90.

Castellani A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42:225-226.

Castro A M (2006) Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*). Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro – RJ.

Castro A M, Carvalho M L A, Leite S G F, Junior N P (2010) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 37(2):151–158.

Castro A M, Pedro K C N R, Cruz J C, Ferreira M C, Leite S G F, Pereira N (2010) IOC-4038: A Promising Strain for the Production of a Cellulolytic Complex with Significant β -Glucosidase Activity from Sugarcane Bagasse Cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162(7):2111-2122

Castro A M, Pedro K C N R, Cruz J C, Ferreira M C, Leite S G F, Pereira Jr N (2010) *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic

complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied biochemistry and biotechnology**, 162(7):2111-2122.

CECAV/IBAMA (2008) Instruções normativas para elaboração de estudos espeleológicos. http://www.icmbio.gov.br/cecav/images/download/IN%2002_MMA_Comentada.pdf

Chandra M S, Viswanath B, Reddy B R (2007) Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, 47:323-328.

Chelius M K, Beresford G, Horton H, Quirk M, Selby G, Simpson R T, Horrocks R & Moore J C (2009) Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA. **International Journal of Speleology**, 38:1-10.

Chen H, Qiu W (2010) Key technologies for bioethanol production from lignocelluloses. **Biotechnology Advances**, 28:556-562.

Couto S R, Sanromán M A (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, 22:211–219.

Cubbon B D (1976) Cave flora. In: Ford T D & Cullingford C H D (Eds.), **The science of speleology**. London: Academic: 423-452.

Culver D C (1982) Cave life, evolution and ecology. Cambridge: Harvard University Press.

Culver D C, Pipan T (2009) The biology of caves and other subterranean habitats. Oxford University Press.

Dantas R B, Almeida L F S, Morato L (2013) Geocronologia do grupo bambuí e aspectos da geomorfologia cárstica no Parque Municipal da Lagoa Azul, São Desidério (BA). **ANAIS do 32º Congresso Brasileiro de Espeleologia**, Sociedade Brasileira de Espeleologia, Barreiras, BA.

Delabona P S (2011) Bioprospecção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos - SP.

Delmer D, Amor Y (1995). Cellulose biosynthesis. **Plant Cell**, 7(7):987-1000.

Di Lena G, Patroni E, Quaglia G B (1997) Improving the nutritional value of wheat bran by a white rot fungi. **Journal of Food Science and Technology**, 32:513-519.

Emtiazi G, Naghavi N, Bordbar A (2001) Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. **Biodegradation**, 12:259–263.

Engel A S (2001) Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. **Geomicrobiology Journal**, 18:259–274.

- Engel A S (2007) Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. **Journal of Cave and Karst Studies**, 69:187–206.
- Feije F, Anger V (1972) Spot test in inorganic analysis. **Analytica Chimica Acta**, 149: 363-367.
- Feldhake D J (1986) Microbial activity and bio-mass of limestone caves. Master of Science Thesis, **University of Cincinnati**.
- Fernández-Cortès A, Cuezva S, Sanchez- Moral S, Cañaveras J C, Porca E, Jurado V, Martin-Sanchez P M, Saiz-Jimenez C (2011) Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. **Environmental Science and Pollution Research**, 18:1037-1045.
- Filho J M M A (2008) Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado. **Universidade de São Paulo**, Piracicaba – SP.
- Gadd G M (2004) Mycotransformation of organic and inorganic substrates. **Mycologist**, 18:60–70.
- Geric B, Pipan T, Mulec J (2004) Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the Jama caves (Slovenia). **Acta Carsologica**, 33:301-309.
- Ghose T K (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, 59(2):257-268.
- Gibert J (1986) Ecologie d'un système karstique jurassien. Hydrogéologie, dérive animale, transits de matières, dynamique de la population de *Niphargus* (Crustacé *Amphipode*): **Memoires de Biospéologie**, 13:1–379.
- Gorbushina A (2007) - Life on the rocks. **Environmental Microbiology**, 9:1613-1615.
- Graening G O, Brown A V (2003) Ecosystem dynamics and pollution effects in an Ozark cave stream. **Journal of the American Water Resources Association**, 39:497–505.
- Grigorevski-Lima A L, Da Vinha F N M, Souza D T, Bispo A S R, Bon E P S, Coelho R R R, Nascimento R P (2009) *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied biochemistry and biotechnology**, 155(1-3):18-26.
- Gutkoski L C, Pedó I (2000) Aveia: composição química, valor nutricional e processamento. Varela (Ed.), p. 191, São Paulo – SP.
- Hamer O (1999) Paleontological Statistics. Natural History Museum. **University of Oslo**.
- Hamilton L A, Wase J (1991). Some comparisons of cellulases from two different strains of *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, 26:287–292.

Hargreaves P I (2008) Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celullignina de bagaço de cana. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro,RJ.

Hui Y S, Amirul A A, Yahya A R M, Azizan M N M (2010) Cellulase production by free and immobilized *Aspergillus terreus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 26:79–84.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD (1990) Manual de los derivados de la cana de azucar. Bagazo (ed.), Cuban Institute of Research on Sugarcane. México, p. 62.

Irwin D C, Spezio M, Walker L P, Wilson D B (1993) Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. **Biotechnology and Bioengineering**, 42:1002-1013.

Jäger S, Brumbauer A, Feher E, Réczey K, Kiss L (2001) Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 17:455-461.

Jahangeer S, Khan N, Jahangeer S, Sohail M, Shahzad S, Ahmad A, Khan S A (2005) Screening and characterizations of fungal cellulase isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany**, 37(3):739-748.

Jeffries T W, Sykes M S, Rutledge-Cropsey K, Klungness J H, Abubakr S (1995) Enhanced removal of toners from office waste papers by microbial cellulases. In **Sixth International Conference Biotechnology Pulp Paper Industry** (pp. 141-4). In: Castro A M (2006) Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celullignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*). **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro – RJ.

Jorgensen H, Morkeberg A, Krogh K B R, Olsson L (2005) Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microbiology and Technology**, 36:42–48.

Jurado V; Laíz L; Rodriguez-Nava V; Boiron P; Hermosin B; Sanchez-Moral S; Saiz-Jimenez C (2010) Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. **International Journal of Speleology**, 39(1):15-24.

Kalogeris E, Christakopoulos P, Katapodis P, Alexiou A, Vlachou S, Kekos D, Macris B J (2003) Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process biochemistry**, 38(7):1099-1104.

Kaschuk G, Alberton O, Hungria M (2010) Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, 42:1-13.

- Kato S, Haruta S, Cui Z J, Ishii M, Igarashi Y (2008) Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. **Microbial Ecology**, 56:403-411.
- Koilraj A J, Marimuthu G, Natarajan K, Saravanan S, Maran P, Hsu M J (1999) Fungal diversity inside caves of southern India. **Current Science**, 77: 1081-1084.
- Krishna C (2005) Solid state fermentation systems: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, 25: 1-30.
- Krogh K B R, Morkeberg A, Jorgensen H, Frisvad J C, Olsson L (2004) Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1:113-116.
- Lambais M R; Cury L C; Malluche-Baretta C R; Büll R C (2005) Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciências do Solo**, 4:43-84.
- Lavoie K H, Northup D E (2005) Bacteria as indicators of human impact in caves. **National Cave and Karst Management Symposium**.
- Liu Y T, Luo Z Y, Long C N, Wang H D, Long M N, Hu Z (2011) Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. **New biotechnology**, 28(6):733-737.
- Luangsa-ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong S B, Borman A M, Hywel-Jones N L, Samson R A (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiology letters**, 321(2):141-149.
- Lynd L R, Weimer P J, Zyl W H, Pretorius I S (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66(3):506-577.
- Mandels M, Weber J (1969) Production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, 95: 391.
- Matsuoka M, Mendes I C, Loureiro M F (2003) Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira Ciências do Solo**, 27:425-433.
- McCarthy C B, Diambra L A, Pomar R V R (2011) Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomia longipalpis*, vector of visceral Leishmaniasis, using an unbased high-throughput approach. **PLoS**, 5(9): 1304.
- Moreira F M S, Siqueira J (2006) **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ed, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG. 729p.
- Mulec J (2008) Microorganisms in hypogean: examples from Slovenia karst caves. **Acta Carsologica**, 37(1):153-160.
- Nieves-Rivera Á M (2003) Mycological Survey of Río Camuy Caves Park, Puerto Rico. **Journal of Cave and Karst Studies**, 65(1): 23-28.

Nieves-Rivera Á M, Santos-Flores C J, Dugan F M, Miller T E (2009) Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. **International Journal of Speleology**, 38(1): 61-70.

Northup D E; Dahm C N; Melim L A; Spilde M N; Crossey L J; Lavoie K H; Mallory L M; Boston P J; Cunningham K I; Barns S M (2000) Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. **Journal of Cave and Karst Studies**, 62(2): 80-90.

Northup D E, Lavoie K H (2001) Geomicrobiology of caves: a review. **Geomicrobiology Journal**; 18: 199-222.

Northup D E, Lavoie K H (2004) Microbiology in caves. pp. 506-509. In: Gunn, John (ed.) **Encyclopedia of Cave and Karst Science**. New York: Fitzroy Dearborn Publishers.

Novaková A (2009) Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia): a review. **International Journal of Speleology**, 38(1):71-82.

Paul E A, Clark F E. (1996). Ammonification and nitrification. In: Paul E A, Clark F E, eds. Soil microbiology and biochemistry. San Diego, CA, USA: **Academic Press**, 131–146.

Pavarina E C (1997) Estudo dos sistemas celulolítico e fermentativos de fungos microaeróbios facultativos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, SP.

Pedro E G, Bononi V L R (2007) - Cave fungi of the karst region of the State Touristic Park of the Upper Ribeira Valley (PETAR) in the State of São Paulo in Brazil. **Focus**, 5:65-78.

Pirota R D, Baleeiro F C, Farinas C S (2013) Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. **Biotechnology progress**, 29(6):1430-1440.

Portillo M C, Gonzalez J M, Saiz-Jimenez C (2008) Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain **Journal of Applied Microbiology**, 104:681–691.

Pothiraj C, Balaji P, Eyini M (2006). Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. **African Journal of Biotechnology**, 20:1882–1885.

Pulido-Bosch A, Martin-Rosales W, Lopez-Chicano M, Rodriguez-Navarro C M, Vallejos A (1997) Human impact in a tourist karstic cave (Araceña, Spain). **Environmental Geology**, 31 (3/4):142-149.

Raimbault M (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, 1(3):174-188.

Ramos L P (2001) Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisa em Química Aplicada, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba - PR.

Resende-Stoianoff M A, Silva D L, Taylor E L S, Reis M F, Magalhães T F F, Martins C V B, Silva C M, Santos D A, Fátima A (2012) Activity of aldimines against *Fusarium solani* isolated from bat guano in a neotropical touristic cave. **Mycoses**, 55 (1):102-103.

Rodríguez-Zúñiga U F, Farinas C S, Bertucci Neto V, Couri S, Crestana S (2011) *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(8):912-919.

Ruegger M J S, Tauk-Tornisielo S M (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 27(2):205-211.

Sá Godinho L P, Pereira R G F A (2013) Caracterização morfológica preliminar do sistema cárstico do rio João Rodrigues, São Desidério – BA. **Anais do 32º Congresso Brasileiro de Espeleologia**, Sociedade Brasileira de Espeleologia, Barreiras, BA.

Saha B C, Iten L B, Cotta M A, Wu Y V (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, 21(3):816-822.

Sáiz-Jiménez C, González J M (2007) Aerobiology and cultural heritage: some reflections and future challenges. **Aerobiologia**, 23:89–90.

Sakumaran R K, Singhanian R R, Mathew G M, Pandey A (2009) Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, 34: 421-424.

Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, 27:185-194.

Santamaria S, Faille A (2007) – Rhachomyces (*Ascomycota, Laboulbeniales*) parasites on cave inhabiting Carabid beetles from the Pyrenees. **Nova Hedwigia**, 85:159-186

Schmid G., Wandrey C. (1987). Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase (β -glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414. **Biotechnology and Bioengineering**, 30(4):571-585.

Schmoll M, Franchi L, Kubicek C P (2005) Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. **Eukaryot Cell**, 4:1998–2007.

Semikolennykh A A, Ivanova A E, Dobrovolskaja T G, Gorlenko M V (1975) Soil and gypsum caves microbial communities of karstogenic landscapes of Archangelsk Region (Russia). **14th International Congress of Speleology**, Hellenic Speleological Society.

Shacklette M H, Hasenclever H F (1968) The natural occurrence of *Histoplasma capsulatum* in a cave. 3. Effect of flooding. **American Journal of Epidemiology**, 88(2):210-214.

Silva N L C (2010) Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação de Mestrado. Escola de Química, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro – RJ.

Silveira L T (1985) Isolamento de *Microsporum amazonium* do solo da gruta do Piriá (Município de Viseu - PA). Belém, Universidade Federal do Pará/Departamento de Biologia, 15p. Trabalho de conclusão de curso.

Simon K S, Pipan T, Culver D C (2007) Conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. **Journal of Cave and Karst Studies**, 69(2):279–284.

Singhania R R, Sukumaran R K, Patel A K, Larroche C, Pandey A (2010) Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, 46(7):541-549.

Sonia K G, Chadha B S, Badhan A K, Saini H S, Bhat M K (2008). Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(5):599-604.

Taylor E L S, Stoianoff M A R, Ferreira R L (2013) Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**, 42(3): 267-277.

Tisch D, Schmoll M (2010) Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, 85:1259–1277.

Tolan J S; Foddy B (1999) Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, 65:41-67.

Toljander J F, Artursson V, Paul L R, Jansson J K, Finlay R D (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. **FEMS microbiology letters**, 254(1):34-40.

Tomova I, Lazarkevich I, Tomova A, Kambourova M, Vasileva-Tonkova E (2013) Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. **International Journal of Speleology**, 42(1): 65-76.

Torsvik V, Overas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, 5:240-245.

Urzi C, De Leo F, Bruno L, Albertano P (2010) Microbial diversity in paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the cave of bats (Zuheros, Spain). **Microbial Ecology**, 60:116–129.

Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Park H, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor M L (2006) Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, 77:153-160.

Vaughan-Martini A, Angelini P, Zacchi L (2000) The influence of human and animal visitation on the yeast ecology of three Italian caverns. **Annals of Microbiology**, 50:133-140.

Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, 19:703-707.

Vanderwolf K. J, Malloch D, McAlpine D F, Forbes J (2013) - A world review of fungi, yeasts, and slime mold in caves. **International Journal of Speleology**, 42(1):77-96.

Vieira F C S; Nahas E (2005) Comparison of microbial numbers in soil by using various culture media and temperatures. **Microbiology Resource**, 160:197-202.

Voltatódio M L (2012) Caracterização bioquímica e biofísica da Celobiohidrolase II do fungo *Trichoderma harzianum* IOC3844 produzida por expressão homóloga. Tese de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Física, **Universidade de São Paulo**, São Carlos, SP.

Vries R P, Visser J (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65:497–522.

Wang J, Zhu Zeng Q, Zhang Z, Yan R (2010) A novel endophytic Huperzine A–producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. **Journal of Applied Microbiology**, 109(4):1469–1478.

Walkey A, Black I A (1934) An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, 37:29-38.

White W B (1988) Geomorphology and hidrology of karst terrains. Oxford University Press, New York.

Wilson D B (2008) Aerobic microbial cellulase systems. In Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. Edited by Himmel ME. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2008:374-392. (Chapter 11).

Wollum II A G (1982) Cultural methods for soil microorganisms. In: Miller RH, Keeney DR. Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties. Madison: **Soil Science of American**, 781-802.

Wood T M, Mccrae S I (1979) Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Advances in Chemistry Series**, 181: 181-209, In: Filho J M M A (2008) Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. **Universidade de São Paulo**.

Yoder J.A., Benoit J.B., Christensen B.S., Croxall T.J. & Hobbs III H.H., (2009) - Entomopathogenic fungi carried by the cave orb weaver spider, *Meta ovalis* (*Araneae*,

Tetragnathidae), with implications for mycoflora transfer to cave crickets. **Journal of Cave and Karst Studies**, 71(2):116-120.

Zhang S, Wolfgang D, Wilson D B (1999) Substrate heterogeneity causes the non-linear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, 66:35-41.

Zhang Y H P, Lynd L R (2004) Toward and aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology Bioenergy**, 88:797-824.

Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R (2006) Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, 24:452-481.

Zhang L, Xu Z (2008) Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, 8:379-388.

Zúñiga U F R (2010) Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, **Universidade de São Paulo**, São Carlos – SP.