

INSTITUTO DE BOTÂNICA – IBt

Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente

Curso de Capacitação de Monitores e Educadores

FUNGOS BASIDIOMICETOS

**Técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos
biotecnológicos**

Luciana Jandelli Gimenes

Orientador: Prof. Dr. Dácio Roberto Matheus

2010

INTRODUÇÃO

Os fungos são muito importantes para a vida humana. Estão presentes diariamente em nossas vidas e muitas vezes esquecemos tal importância. No entanto, não notamos essa real participação, sendo que na maioria dos casos fungos são apenas lembrados pelo seu lado negativo, ou seja, pelos danos que alguns deles causam (como parasitando plantas, problemas de alergias e micoses em pessoas ou animais) e os benefícios infelizmente são esquecidos. Direta ou indiretamente, todos os dias as pessoas são beneficiadas por produtos originados pela ação dos fungos, como exemplo, a ação fermentativa de fungos para a fabricação de pães, massas e a síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, processos imprescindíveis na produção de bebidas como cerveja e vinho. Algumas espécies proporcionam sabor e aroma distintos em diferentes tipos de queijos. A produção de cogumelos comestíveis, comum entre populações de outros países, é uma prática biotecnológica que vem crescendo a cada dia no Brasil. Não devemos esquecer sua importância na indústria farmacêutica e a grande descoberta da penicilina. Com o desenvolvimento da biotecnologia, muitas espécies de fungos estão sendo estudados para aplicação no tratamento de resíduos industriais têxteis e papeleiros de difícil degradação, no tratamento de esgotos e biorremediação de solos (descontaminação de solos pela ação dos fungos).

Os fungos representam vários grupos, sendo popularmente conhecidos como cogumelos, mofos, bolores ou leveduras e apresentam vários tamanhos, cores e formas. Existem milhares de fungos em grupos distintos de acordo com características comuns entre eles.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

Desde a década de 60, a partir de estudos morfológicos, bioquímicos e citológicos, os fungos deixaram de pertencer ao reino das plantas e passaram a ter um reino próprio chamado de Reino Fungi. Ainda hoje é utilizada essa classificação, mas os avanços da biologia molecular e estudos

bioquímicos levaram a outras propostas de classificação em que os fungos e organismos afins foram incluídos em três diferentes reinos: Protozoa, Chromista e Fungi, como apresentado na 10ª edição do *Dictionary of the Fungi* (Kirk *et al.* 2008).

Os fungos são aclorofilados (não realizam fotossíntese), eucariotos, a reprodução pode ser sexuada e/ ou assexuada por esporos, unicelulares (leveduras e quitrídias) ou multicelulares (fungos filamentosos), são organismos heterotróficos, apresentam nutrição por absorção, a parede celular é constituída por quitina e β -glucanos, o glicogênio é a principal forma de armazenamento energético e estão presentes em diferentes substratos (dependendo do grupo de fungos).

Os fungos basidiomicetos mais conhecidos formam estruturas de reprodução macroscópicas e são conhecidos popularmente por cogumelos e orelhas de pau, além de outros grupos que são menos conhecidos que são os fungos gelatinosos, os “gasteromicetos”, as ferrugens e os carvões. Estão presentes em ambientes aquáticos e terrestres, podem ser parasitas, sapróbios e micorrízicos. São na sua maioria saprófitas e participam da decomposição de folhas, galhos e troncos, sendo encontrados em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas. Sua grande importância, em termos ecológicos é o papel que desempenham na ciclagem de nutrientes.

PROTOCOLO DE COLETA DE BASIDIOMICETOS

É necessário estabelecer um protocolo para haver uma padronização das coletas. Pode-se fazer uma coleta aleatória, onde buscamos em todos os substratos, abrangendo toda a área, trilhas pré-existentes (**figura 1**) e em todas as estações do ano. Já através do uso de parcelas, há uma definição dos parâmetros estudados, como tamanho e forma das áreas, tempo de coleta e demarcação de substratos.

Recomenda-se que a coleta seja realizada no período da manhã para dispor do resto do dia para a descrição e preparo do material coletado. Devem-se evitar os períodos chuvosos, pois os

cogumelos ficam muito encharcados dificultando a secagem e havendo assim uma maior possibilidade de embolorar.



Figura 1: área de coleta aleatória em trilhas pré-existentes.

Para a coleta, o material básico (**figura 2**) necessário é:

📷 Máquina fotográfica: para tirar fotos dos cogumelos no local de coleta, pois muitos deles até chegarem ao laboratório mudam algumas características como coloração, tamanho, etc.

🔪 Faca ou canivete: para auxiliar a retirada do basidioma do substrato e sempre que possível, trazer junto parte do substrato.

👛 Sacos de papel pardo: colocar individualmente a amostragem para evitar a mistura de esporos. Acondicioná-los de forma a manter bastante ar no seu interior, evitando assim, danificar os fungos coletados.

📝 Caneta e caderneta: para anotar detalhes importantes como substrato, coloração, local de coleta, etc.

👉 Lupa de mão: para verificar algumas características que posteriormente possam mudar até a chegada ao laboratório.

👉 GPS: para georreferenciar o local de coleta.

👉 Sacola de plástico: para o transporte de todos os sacos de papel pardo.

👉 Caixas diversas: para o transporte de espécimes frágeis.

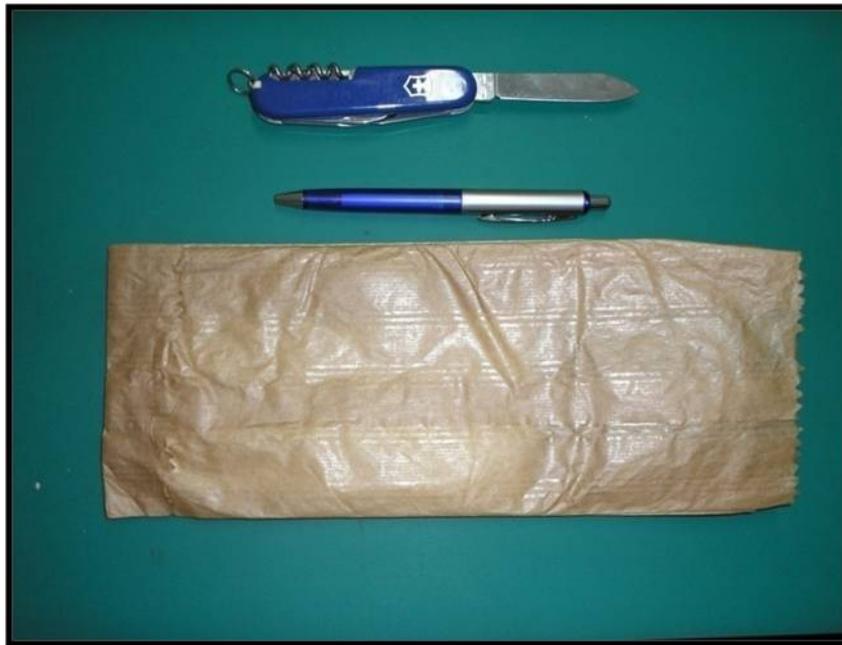


Figura 2: alguns dos materiais básicos para coleta.

Sempre devemos coletar um número suficiente de basidiomas para que seja possível fazer o isolamento, a identificação e obter material de referência para depositar no herbário.

A **figura 3** mostra uma ficha que auxilia muito nas coletas de campo onde consta grande parte das características que devem ser anotadas no momento da coleta. Posteriormente, no momento da descrição dos materiais coletados, essa ficha será de grande ajuda.

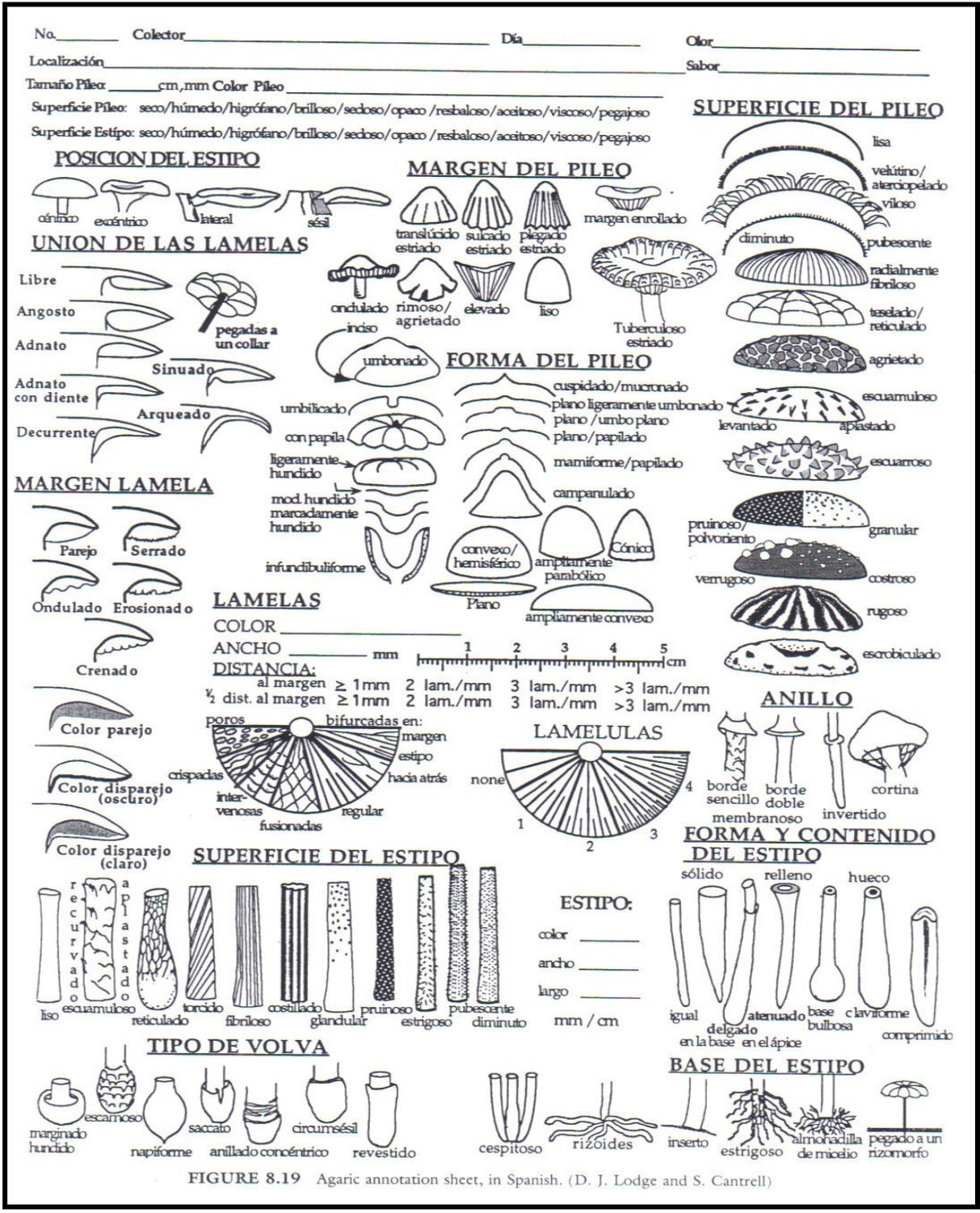


FIGURE 8.19 Agaric annotation sheet, in Spanish. (D. J. Lodge and S. Cantrell)

Figura 3: anotações de campo de cada espécime coletado (retirado de Mueller *et al.* 2004, Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods).

DESCRIÇÃO DO MATERIAL

Após a coleta, os materiais devem ser levados ao laboratório, dado um número de coletor e feitas todas as anotações macroscópicas necessárias (**figura 4**). Esta análise deve ser feita a olho nu e também com auxílio do microscópio estereoscópico. As características principais a serem anotadas são (Largent 1986):

- 🍄 Píleo (forma, coloração, consistência, superfície, margem, diâmetro)
- 🍄 Lamelas (fixação ao estipe, coloração, distância)
- 🍄 Estipe (forma, superfície, presença ou não de anel, volva, rizomorfa, micélio na base, comprimento)

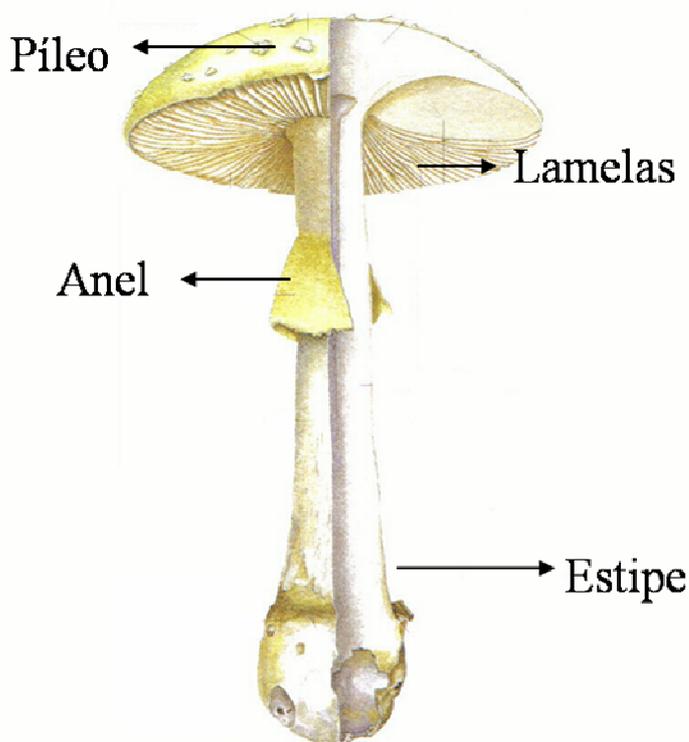


Figura 4: desenho esquemático de um basidioma.

OBTENÇÃO DE CULTURAS

Como já citado anteriormente, a reprodução dos cogumelos ocorre de duas maneiras: sexuada e assexuadamente. No laboratório a multiplicação dos fungos pode também ser feita por dois processos: através da obtenção de culturas a partir de qualquer parte do cogumelo (assexuadamente) ou a partir dos esporos (sexuadamente).

Quando se faz opção pela obtenção da cultura a partir do basidioma (assexuadamente), em fungos carnosos, o processo consiste em retirar um pequeno fragmento do material, com o auxílio de um bisturi e de uma pinça, devidamente esterilizados. Para fungos membranáceos, utiliza-se qualquer parte do basidioma, previamente limpo em solução de hipoclorito de sódio e água destilada para desinfecção e lavagem, respectivamente (Schulz *et al.* 2003). Em ambos os casos, três a quatro fragmentos devem ser dispostos em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados a 28 °C para que haja o crescimento micelial.

A esporada (**figura 5**), maneira sexuada, só deve ser realizada quando coletado mais de um basidioma, pois, após ficarem 24 horas em câmara úmida, o fungo normalmente apodrece. A esporada consiste em depositar o píleo com as lamelas para baixo num papel próprio (metade branca, metade preta). Cobre-se com uma placa de Petri, formando uma espécie de câmara úmida, por até 24 horas, para que os basidiósporos caiam no papel. Após este período, devem-se secar os papéis em sílica gel, dobrar, inserir num saco de polipropileno e guardá-los em geladeira. No momento que surgir o interesse em se fazer uma cultura pura a partir da esporada, um pequeno fragmento do papel deve ser cortado, colocado em água destilada autoclavada e 1 mL deve ser colocado em meio de cultura BDA. Após o crescimento, para preservação da cultura, prepara-se pelo método de Castellani (Arora *et al.* 1991, Smith & Onions 1994) e incorpora-se à uma coleção que no caso do Instituto de Botânica, é Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt).

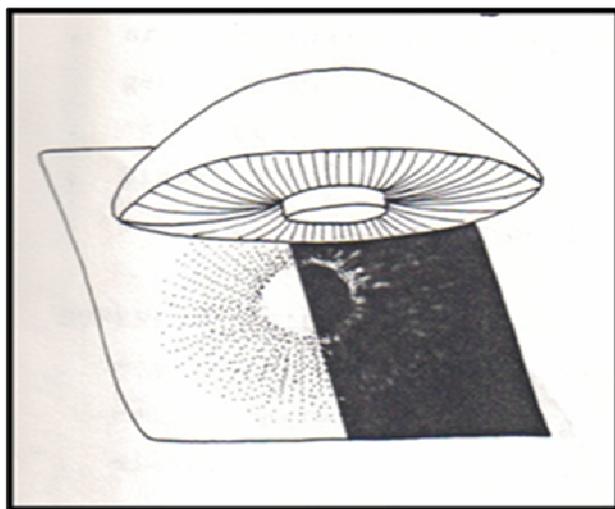


Figura 5: esporada (Fonte: Gugliotta & Capelari, 1998).

HERBORIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL

Depois de realizadas todas as anotações, os materiais devem ser secos em estufa entre 45-50°C (fungos carnosos) ou, quando os basidiomas são menos carnosos, a secagem deve ser feita em dessecador com sílica. A secagem no dessecador com sílica é mais interessante quando há a intenção de se fazer extração de DNA, pois materiais submetidos a altas temperaturas tem uma maior chance de degradação do DNA. Após a secagem, os materiais devem ser acondicionados em sacos de polipropileno, e colocados nos próprios sacos de papel, onde estavam todas as anotações da coleta.

ANÁLISE MICROSCÓPICA E IDENTIFICAÇÃO

Depois da secagem, realiza-se a identificação que é baseada nos caracteres morfológicos. Para a análise microscópica dos caracteres, são feitos cortes a mão livre (Largent *et al.* 1986), com o auxílio de uma lâmina de barbear. Para auxiliar a reidratação do material, o fragmento é imerso em álcool 70% e, posteriormente monta-se entre lâmina e lamínula com KOH 4% (Martin 1934 *In* Fonseca 1999). As observações e medidas são executadas com auxílio de microscópio óptico ou

eletrônico. Faz-se o desenho das estruturas microscópicas com auxílio de câmara-clara acoplada ao microscópio. Anota-se as características dos basidiósporos, basídios, cistídios, trama da lamela e superfície pilear. A identificação é feita utilizando-se chaves de identificação e referências bibliográficas específicas para cada grupo.

Após a identificação, montam-se exsicatas de acordo com o padrão do herbário em que serão depositados os materiais coletados. No caso do Instituto de Botânica, o material é depositado no Herbário “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” (SP) e duplicatas podem ser enviadas a outros herbários.

HERBÁRIO

Herbário (**figura 6**) é uma coleção dinâmica de plantas, fungos ou algas secas, prensadas e/ou montadas de uma forma especial que sirva como referência para estudos de vários fins, como por exemplo, nos estudos de identificação de um material desconhecido, através da comparação pura e simples com outros espécimes da coleção herborizada. Os herbários abrigam uma grande quantidade de informação e dados sobre a diversidade assim como é também um centro de treinamento e capacitação de pessoal especializado em taxonomia. Os materiais herborizados e identificados que constituem a coleção do herbário são chamadas exsicatas.

Herbário é de extrema importância, pois possibilita a conservação de materiais históricos, a avaliação de impactos ambientais e a identificação de espécies, representa a flora de uma região e contribui para pesquisas em outras áreas da ciência.



Fotos: L. J. Gimenes

Figura 6: Herbário com as exsiccatas depositadas.

FUNGOS BASIDIOMICETOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando basidiomicetos baseia-se nos seus produtos metabólicos (enzimas e polissacarídeos) (**figura 7**). A importância do processo enzimático nos fungos está ligada na transformação dos resíduos lignocelulósicos, para a produção de polissacarídeos utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética como também para a produção de alimentos, como exemplo, o cultivo de cogumelos. Ainda, esse processo enzimático está

relacionado também com os processos de biodegradação de compostos xenobióticos (compostos orgânicos sintetizados industrialmente), como exemplo a biorremediação ambiental de solos e o tratamento de efluentes da indústria papeleira e têxtil (Bononi, 1998)

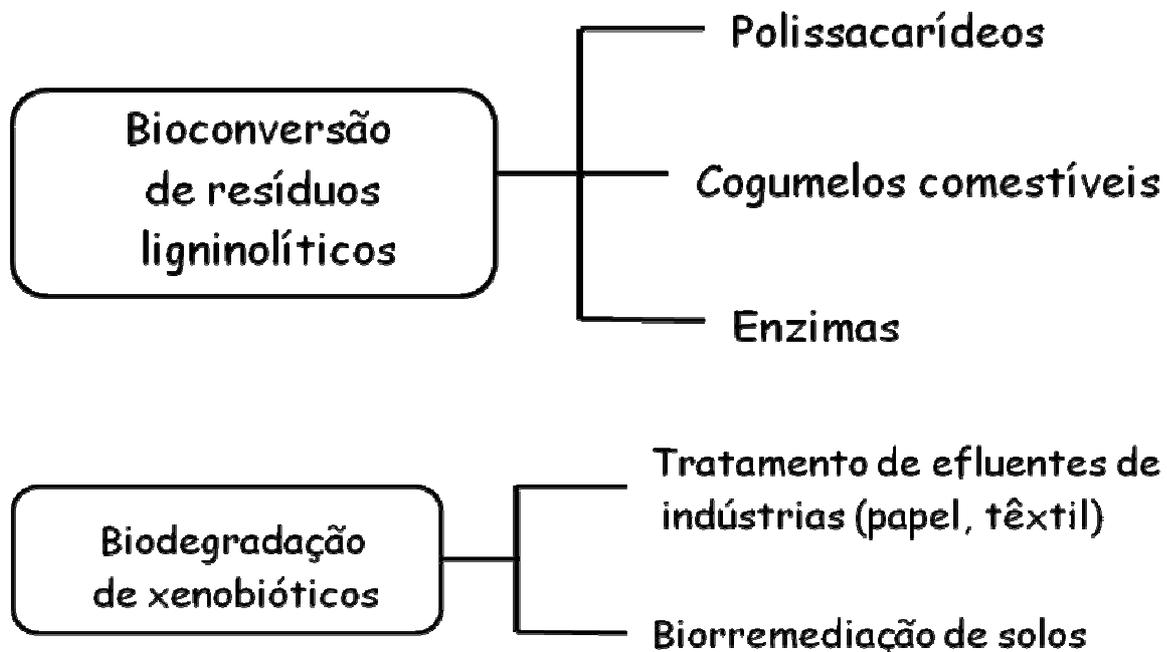


Figura 7: esquema mostrando as possibilidades de uso de basidiomicetos (Fonte: Matheus & Okino, 1998).

Grande parte das espécies de fungos basidiomicetos utiliza os componentes de madeira para crescimento. Nos fungos degradadores de madeira, destacam-se dois grupos:

✓ **Fungos causadores de podridão branca:** degradam celulose, hemicelulose e lignina, quebrando-as em moléculas menores até CO_2 e H_2O . Por isso são chamados de fungos lignocelulolíticos. Os fungos quando degradam a madeira causam a perda de resistência, tornando-a laminada, esponjosa e fibrosa e com uma coloração branca, resultando então o nome de podridão branca (**figura 8**).



Figura 8: Podridão branca (Foto: A. M. Gugliotta)

✓ **Fungos causadores de podridão parda:** degradam celulose e hemicelulose. Nos estágios finais de degradação, a madeira apresenta numa aparência amorfa e escura (**figura 9**).



Figura 9: Podridão parda (Foto: A.M. Gugliotta)

BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Do ponto de vista econômico, um dos processos mais importantes utilizando fungos na transformação de resíduos lignocelulósicos é a produção de cogumelos comestíveis.

Estima-se que aproximadamente 2.000 espécies são potencialmente comestíveis, sendo que aproximadamente 25 são usadas na alimentação humana e menos ainda cultivadas. No Brasil, este número é mais reduzido ainda. O brasileiro é ainda muito reticente ao consumo. Do ano de 1968 até 2004 a produção de cogumelos comestíveis no Brasil passou de 20 para 5.000 toneladas. Alguns

exemplos de cogumelos cultivados no Brasil: *Boletus edulis* (fungi secchi), *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* (shiitake), *Agaricus bisporus* (champignon de Paris). Há também os que não são cultivados comercialmente, mas são nativos e comestíveis: *Auricularia fuscossuccinea*, *Oudemansiella canarii*, *Macrolepiota procera* e *Polyporus tenuiculus*.

Curiosidades sobre fungos tóxicos e venenosos: Na natureza, existem fungos tóxicos e venenosos que podem provocar a morte de homens e animais. O perigo varia dependendo da quantidade e do fungo ingerido e também do estado do animal e físico da pessoa (crianças e idosos são mais sensíveis). O grau de toxicidade varia de espécie para espécie, podendo causar desde ligeiras perturbações estomacais e intestinais até irreparáveis lesões nos rins e fígado, ocasionando a morte.

Até o momento não se conhece antídotos para cogumelos venenosos. Portanto, não se recomenda o consumo de cogumelos silvestres sem a prévia identificação por um especialista.

Cogumelos que não ocorrem naturalmente no Brasil podem ser introduzidos com mudas de plantas trazidas de outros países que tenham esporos ou hifas microscópicas que crescem e passam a habitar locais distantes de suas origens. Por isso que o Ministério da Agricultura faz o período de quarentena de plantas e animais vindos de outros países para diminuir a chance de disseminação de doenças e pragas.

Um exemplo disso é a *Amanita muscaria* (**figura 10**) que não havia no Brasil e foi introduzida juntamente com sementes de *Pinus*, principalmente nos estados de São Paulo e Paraná. É um cogumelo tóxico e venenoso, mas na maioria das vezes causa apenas perturbações estomacais, mas pode causar a morte no caso de pessoas debilitadas.

Mas como podemos separar um tóxico ou venenoso de um cogumelo comestível? Na verdade, não existe uma característica única e facilmente visível que permita essa diferenciação. Há

uma associação de várias características que permite ao especialista saber qual é a espécie e determinar se ela é ou não comestível. Em determinados casos há a necessidade de realizar uma análise química do cogumelo para a verificação de substâncias tóxicas.

Mas cuidado, existem na tradição popular algumas práticas que são utilizadas para verificar se um cogumelo é venenoso ou não. São crendices sem fundamento e não servem para tal verificação!!

No campo, às vezes, vemos cogumelos comidos por animais e isso não é nenhum indício que podemos ingeri-los. Comparando com as plantas venenosas, as espécies de fungos venenosos são bem menores, mas são muito mais perigosos porque matam impiedosamente.



Figura 10: *Amanita muscaria*

BIORREMEDIAÇÃO AMBIENTAL

Biorremediação é o uso de microrganismos para controlar e destruir poluentes sendo uma alternativa tecnológica necessária, não apenas pelo baixo custo, mas também pela possibilidade de se obter a completa degradação dos compostos contaminantes. Por se tratar de processo biológico, a biorremediação constitui uma tecnologia eficiente do ponto de vista ambiental (Machado 1998, Matheus & Machado 2002).

As vantagens da biorremediação são: apresenta um baixo custo, pode ser realizada em temperatura e pressão ambiente, utiliza metabolismos degradativos do próprio ambiente, não há transferência do problema, é segura do ponto de vista ambiental e há a transformação do contaminante até a mineralização transformando-o em CO₂, H₂O e sais orgânicos.

Devido à capacidade de degradar lignina por meio de um sistema enzimático inespecífico, convertendo-a em CO₂ e água, os fungos basidiomicetos apresentam um grande potencial de aplicação em processos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (Matheus & Okino 1998, Matheus 2003). A capacidade dos fungos de podridão branca em degradar lignina torna-os o grupo mais interessante dentre os fungos para utilização em biorremediação de compostos recalcitrantes.

No Brasil, diversos estudos sobre a possibilidade de uso de basidiomicetos em biorremediação vem se desenvolvendo. Estudos recentes mostram que os basidiomicetos apresentam um grande potencial em processos de biorremediação de solos contaminados com organoclorados e que espécies nativas, como *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel (**figura 11**) que é uma das espécies selecionadas por apresentar capacidade de degradação de poluentes.



Figura 11: *Trametes villosa*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arora, S.K., Elander, R.P. & Mukerji, K.G. 1991. Handbook of applied mycology - Fungal Biotechnology, v.4, New York.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M, 1996. Introductory Mycology. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p.
- Bononi, V.L.R. (org), 1998. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 184p.
- Bononi, V.L.R.; Capelari, M.; Mazieiro, R.; Trufem, S.F.B., 1995 Cultivo de cogumelos comestíveis. São Paulo, Ícone. 206p.
- Fidalgo, O. & Bononi, V. L. R., 1989. Técnicas de coleta – material botânico, preservação e herborização de material botânico. Instituto de Botânico. São Paulo. 62p. ilustr.
- Fonseca, M.P. 1999. Aphylophorales lignocelulíticos da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kirk, P.M., Canon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. 2008. Dictionary of the fungi. CAB

International, Wallingford.

Largent, D.L. 1986. How to identify mushrooms to genus. I. macroscopic features. Mad River Press, Eureka.

Largent, D.L., Johnson, D. & Watling, R. 1986. How to identify mushrooms to genus. III. microscopic features. Mad River Press, Eureka.

Machado, K.M.G. 1998. Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados por resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 172 p.

Matheus, D.R. & Okino, L.K. 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. *In*: Bononi, V. L. R. & Grandi, R. P. (eds.) Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, Secretaria de estado do Meio Ambiente, 184 p.

Matheus, D. R. & Machado, K. M. G. 2002. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. *In*: Fernicola, N. A. G. & Oliveira, S. S. (Orgs). Produtos orgânicos persistentes – POPs. S.S.(Ed.). Salvador, CRA 13: 479-500.

Matheus, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.

Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M. S. 2004. Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods. Eds. New York, Academic Press, pp. 123-168.

Raven P. H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 1992. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. 5º ed. 728p.

Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S. & Aust, H.-J. 2003. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research* 97: 1447-1450.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus, pela orientação dedicada no trabalho de doutorado além da revisão desse texto;

À Dra. Adriana de Mello Gugliotta, pelas inúmeras sugestões e revisão deste texto;

À CAPES pelo auxílio financeiro através da bolsa de doutorado, concedida pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo;

Ao Instituto de Botânica, em razão da cessão das instalações e pela infra-estrutura oferecida, principalmente à Seção de Micologia e Liquenologia pela utilização de laboratórios e equipamentos.