

Avaliação da capacidade decompositora de fungos saprófitos isolados de sapal

1. Fundamentação Teórica

A decomposição da matéria orgânica vegetal é um processo central nos ciclos biogeoquímicos (C, N, P), largamente mediado por fungos saprófitos. Estes organismos produzem enzimas extracelulares capazes de degradar polímeros estruturais da parede celular vegetal, nomeadamente celulose, hemicelulose e lenhina.

A degradação destes compostos permite a libertação de monómeros que podem ser assimilados e metabolizados através de vias centrais como a glicólise e o ciclo de Krebs. A eficiência de decomposição é influenciada por vários fatores nomeadamente a composição química do substrato. Tecidos vegetais com baixo teor de lenhina são geralmente mais facilmente degradáveis, enquanto substratos ricos em compostos fenólicos e lenhina apresentam maior recalcitrância estrutural.

Em ambientes de sapal, as pressões ecológicas favorecem versatilidade metabólica e adaptação a substratos complexos. Além da capacidade individual, interações entre estirpes podem influenciar significativamente o processo decompositor, afetando colonização e eficiência funcional.

A inclusão de guaiacol no meio permite avaliar a atividade ligninolítica dos fungos, uma vez que enzimas como peroxidases ou lacases oxidam guaiacol formando coloração castanho-avermelhada, servindo como marcador visual de degradação de compostos fenólicos.

2. Objetivos

- Avaliar a capacidade de crescimento e potencial decomposição de substratos vegetais por fungos saprófitos isolados de sapal.
- Analisar as interações entre estirpes em co-inoculação.
- Analisar o efeito da composição química do substrato vegetal.
- Analisar o efeito da temperatura.
- Detectar atividade ligninolítica através da oxidação de guaiacol incorporado no meio.

3. PRÉ-AULA – Preparação do meio de cultura e substratos

Materiais

- Meio agar-água
- Guaiacol (solução a 1% p/v)
- Folhas de *Spinacia oleracea*, espinafre
- Folhas de *Quercus coccifera*, carrasco

- Celulose microcristalina
- Estufa (50–60 °C)
- Moinho
- Autoclave
- Placas de Petri estéreis

Preparação dos substratos

1. Secar o material vegetal a 50–60 °C até peso constante.
2. Moer até obter partículas < 1 mm.

Preparação do meio de cultura

1. Preparar o meio agar água sólido (20 g L⁻¹) com (1% p/v de folhas de espinafre ou de carrasco ou de celulose microcristalina) e sem fonte adicional de carbono.
2. Autoclavar (110 °C, 40 min).
3. Após arrefecimento para ~50 °C.
4. Adicionar guaiacol por filtração para concentração final de 0,01% p/v.
5. Homogeneizar cuidadosamente.
6. Verter em placas sob condições assépticas.

Preparar:

- Placas com espinafre
- Placas com sobreiro
- Placas com celulose microcristalina
- Placas com meio agar água sem fonte de carbono (controlo negativo)

4. 1ª Aula Laboratorial (23 de março) – Inoculação

Materiais

- Estirpe F1 (da ecologia)
- Estirpe F2 (da ecologia)
- Placas preparadas na pré-aula
 - Placas com espinafre
 - Placas com sobreiro
 - Placas com celulose microcristalina
 - Placas com meio agar água sem fonte de carbono
- Pipeta P1000 e pontas azuis estéreis
- Água estéril
- Palitos estéreis
- Pipetas P20 e pontas amarelas ou brancas estéreis
- Estufas (temperatura ambiente ~19-20 °C, 28 °C)

Procedimento

A. Isolamento de esporos

1. Inocular 2 mL de água estéril no centro da colónia.
2. Com a ajuda do palito, raspar a superfície das colónias para libertar os esporos.

3. Agitar a placa com movimentos circulares durante 1 minuto.
4. Recolher para um eppendorf estéril, com a ajuda de uma micropipeta, a suspensão.
5. Homogeneizar no vórtex.
6. Inocular 10 μ L da suspensão de cada estirpe (para confirmar a viabilidade) no centro de placas com meio PDA.
7. Incubar a 28 °C e conservar as suspensões a 4 °C.

Nota: Para utilizar inóculos padronizados, nas tarefas seguintes, cada grupo deverá utilizar os inóculos fornecidos e não os que acabaram de preparar.

B. Culturas Individuais fornecidas em eppendorfs

8. Inocular 10 μ L no centro da placa de cada estirpe.
9. Incubar à temperatura definida.

C. Co-inoculação (Interação entre estirpes)

1. Inocular 10 μ L de F1 a ~3 cm de uma extremidade da placa.
2. Inocular 10 μ L de F2 na extremidade oposta.
3. Incubar nas mesmas condições.

Cada grupo deverá testar todos os substratos nas diferentes temperaturas atribuídas.

5. 2ª Aula Laboratorial – Avaliação

Avaliar:

- Crescimento micelial (diâmetro em mm) em mais do que uma direção, ou seja, fazer uma cruz na caixa (no centro da colónia) e medir o diâmetro nas duas direções
- Taxa de crescimento (mm/dia)
- Alterações visuais no substrato
- Formação de linha de confronto em co-inoculações
- Sobreposição ou inibição de crescimento
- Diferenças entre substratos
- Diferenças entre temperaturas
- Comparação entre culturas individuais e co-cultura
- Comparação com controlo negativo
- Oxidação de guaiacol: presença e intensidade de coloração castanho-avermelhada ao redor do micélio

6. Guião de discussão e análise crítica

Os estudantes podem analisar os resultados considerando os seguintes pontos:

A. Interpretação Fisiológica

1. O crescimento observado permite concluir utilização efetiva do substrato como fonte de carbono?

2. Porque é expectável maior crescimento em substratos com menor teor de lenhina?
3. Que enzimas extracelulares estarão envolvidas na decomposição (celulases, peroxidases, lacases)?
4. A taxa de crescimento reflete necessariamente maior eficiência decompositora?
5. A coloração do guaiacol confirma atividade ligninolítica? Difere entre estirpes ou substratos?

B. Análise Experimental

6. Porque é essencial utilizar meio mínimo sem fonte adicional de carbono?
7. Limitações do uso de material vegetal triturado.
8. Avaliação visual é suficiente para confirmar degradação?
9. Métodos quantitativos para mineralização efetiva.

C. Interações Microbianas

9. A co-inoculação alterou o padrão de crescimento?
10. Foi observada inibição, sobreposição ou coexistência?
11. A interação variou consoante o substrato?
12. Em substratos mais recalcitrantes (ex.: carrasco), a co-cultura apresentou vantagem?
13. Que mecanismos podem explicar antagonismo (ex.: metabolitos secundários)?
14. Pode existir complementaridade enzimática entre estirpes?

D. Contexto Ecológico

12. Como estas interações podem influenciar a decomposição em sapais ou outros ecossistemas?
13. Que impacto poderá ter a temperatura sob cenários de alterações climáticas?
14. A decomposição é um processo individual ou emergente da comunidade?

7. Síntese Final

Os estudantes deverão:

- Relacionar composição do substrato com crescimento fúngico
- Interpretar interações interespecíficas em contexto funcional
- Discutir limitações metodológicas
- Avaliar criticamente resultados qualitativos
- Propor melhorias experimentais
- Contextualizar os resultados em ecossistemas de sapal

8. Sugestão de bibliografia

- Baldrian, P. (2008). Enzymes of saprotrophic basidiomycetes involved in lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 501–521.
- De Boer, W., & Van Der Wal, A. (2008). Interactions between saprotrophic fungi and bacteria in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 297–312.

- Madigan, M. T., et al. (2018). Brock Biology of Microorganisms. Pearson.
- Strickland, M. S., & Rousk, J. (2010). Considering fungal:bacterial dominance in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 1385–1395.