

LEVANTAMENTO DE FUNGOS TERMÓFILOS ASSOCIADOS
A PILHAS DE CAVACOS DE *Eucalyptus* spp.

CELSO GARCIA AUER

Orientador: Prof. Dr. TASSO LEO KRÜGNER

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1986

A meus pais,
Dervita e Ernesto
dedico.

A Deus,
agradeço.

AGRADECIMENTOS

Pelas inúmeras colaborações prestadas, difícil será relacioná-las, mas faz-se necessário e mister reconhecer e agradecer:

Ao Professor Dr. *Tasso Leo Krüger*, pelos ensinamentos, experiência adquirida e orientação;

Ao Professor Dr. *Luiz E.G. Barichello*, pelo apoio, ensinamentos e orientação;

Aos Professores Dr. *Hiroshi Kimati*, Dr. *Paulo de C.T. de Carvalho*, Dr. *Clélio Lima Salgado*, Dr. *Eria Balmer*, Dr. *Armando Bergamin Filho*, pelos ensinamentos;

Ao Instituto de Botânica - SP, na pessoa dos professores Dr. *Adauto Ivo Milanez* e Dra. *Sandra F.B. Trufem*, pelos ensinamentos e orientação nos trabalhos de identificação dos fungos;

Aos Eng^o Ftal. Mestre *Marcio Pinheiro Ferrari* e Eng^o Agr^o Mestre *Wagner Bettiol*, pela grande amizade, apoio, colaboração e sugestões;

Aos acadêmicos *Isabel Tsutsumi*, pela colaboração nos ensaios e *Luís Eduardo Aranha Camargo*, pelas sugestões;

A *Champion Papel e Celulose S/A*, na pessoa do Engº Químico *Flávio Tesser* e ex-funcionário Engº *Etal. Ricardo Ardente de Almeida*, pelo apoio e pelas facilidades para o desenvolvimento da pesquisa;

A *Secretaria de Tecnologia Industrial - STI/MIC*, pelo financiamento dos trabalhos de pesquisa;

A *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP*, pela bolsa de estudos fornecida;

A turma de *alunos da pós-graduação em Fitopatologia*, que de uma maneira ou outra favoreceram o desempenho dos trabalhos científicos;

Aos funcionários dos *Depto. de Fitopatologia* e do *Depto. de Ciências Florestais*, pelo grande auxílio prestado.

Í N D I C E

	Pág.
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
I - INTRODUÇÃO	01
II - REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Armazenamento de madeira na forma de ca vacos	03
2.2. Características gerais de microrganís - mos termófilos	06
2.3. Pilhas de cavacos com auto-aquecimento.	09
III - MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Montagem, monitoramento da pilha e cole ta de cavacos de eucalipto	16
3.2. Atividades conduzidas no laboratório ..	24
3.2.1. ENSAIO 1 - Teste com diferentes meios de cultura pura para isola mento de microrganismos termófi- los	24
3.2.2. ENSAIO 2 - Comparação entre BDA e hidrolisado de madeira-ágar pa ra isolamento de fungos termófi- los	25

3.2.3. Isolamento de fungos termófilos a partir dos cavacos coletados da pilha	26
3.2.4. Isolamento de fungos termófilos em vários locais próximos à fábrica de papel	27
3.2.5. ENSAIO 3 - Determinação de taxas de crescimento micelial, dos fungos termófilos isolados, em diferentes temperaturas	29
3.2.6. ENSAIO 4 - Avaliação da germinação dos esporos de fungos termófilos, em diferentes temperaturas	30
3.2.7. ENSAIO 5 - Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono no desenvolvimento de três fungos termófilos	31
3.2.8. ENSAIO 6 - Teste de hidrolisado de madeira-ágar com meio de cultura para fungos termófilos, isolados de cavacos de eucalipto	34
3.4. Identificação dos fungos termófilos isolados da pilha de cavacos de eucalipto com auto-aquecimento	34
IV - RESULTADOS	36
4.1. Monitoramento das condições da pilha com auto-aquecimento	36
4.2. Atividades conduzidas no laboratório	41
4.2.1. Efeito de diferentes meios de cultura no isolamento de microrganismos termófilos	41

4.2.2. Frequência de fungos termófilos em pilhas de cavacos de eucalipto e em vários pontos da fábrica de papel	44
4.2.3. Avaliação das taxas de crescimento micelial dos fungos isolados, sob diferentes temperaturas	50
4.2.4. Avaliação do período latente de germinação dos esporos de fungos isolados, sob diferentes temperaturas...	54
4.2.5. Efeito de diferentes fontes de carbono no desenvolvimento de três fungos termófilos isolados	56
4.2.6. Avaliação do hidrolisado de madeira- ágar como meio de cultura para fungos termófilos isolados de cavacos de eucalipto.....	58
4.3. Identificação dos fungos termófilos isolados da pilha de cavacos de eucalipto com auto - aquecimento	60
 V - DISCUSSÃO.....	63
5.1. Monitoramento da pilha de cavacos	63
5.2. Isolamento de fungos termófilos	64
5.3. Crescimento de fungos termófilos em diferentes temperaturas	66
5.4. Germinação de esporos de fungos isolados em diferentes temperaturas	68
5.5. Crescimento de fungos isolados em algumas fontes de carbono	69
 VI - CONCLUSÕES	73
 VII - LITERATURA CITADA	73

LEVANTAMENTO DE FUNGOS TERMÓFILOS
ASSOCIADOS A PILHAS DE CAVACOS DE *Eucalyptus* SPP.

AUTOR: Celso Garcia Auer

ORIENTADOR: Tasso Leo Krüchner

RESUMO

O isolamento de fungos termófilos a partir de cavacos de eucalipto apresentando auto-aquecimento, com temperaturas máximas variando de 53 - 62°C, mostrou a ocorrência de *Aspergillus* sp., *Dactylomyces thermophilus*, *Penicillium bacillusporum*, *Rhizomucor* sp., *Sporotrichum* sp. e *Thermoascus aurantiacus*. Com exceção de *D. thermophilus*, estes fungos foram também isolados de solo de talhões florestais de eucalipto, do ar e de águas residuais para lavagem de toras e da lagoa de tratamento de efluentes.

Foram avaliadas as frequências relativas de cada fungo isolado, observando-se a ausência de padrões definidos de distribuição nos pontos amostrados no decorrer do período de armazenamento.

A análise das taxas de crescimento micelial, em meio BDA, nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C indicou as temperaturas ótimas de 30°C para *Aspergillus* e *P. bacillisporum*; 40°C para *Rhizomucor* e 50°C para *D. thermophilus*, *Sporotrichum* e *T. aurantiacus*. Não houve crescimento nas temperaturas de 60 e 70°C. A incubação de esporos em ágar-água a 20, 30, 40 e 50°C, mostrou que somente *Aspergillus*, *P. bacillisporum* e *Rhizomucor* apresentaram germinação de esporos a 20°C. Os pontos ótimos de germinação dos conídios se aproximaram dos pontos ótimos de crescimento micelial.

Foi avaliado o efeito de dextrose, sacarose, amido, hidrolisado de madeira e carboximetil celulose como fontes de carbono a *Aspergillus*, *Rhizomucor* e *T. aurantiacus*. Não houve diferenças significativas entre dextrose, sacarose e amido, porém estas fontes foram significativamente superiores ao hidrolisado de madeira e carboximetil celulose. O crescimento inadequado dos fungos nestas últimas fontes de carbono sugere a sua incapacidade para degradação de hemicelulose e celulose.

SURVEY OF THERMOPHILIC FUNGI
ASSOCIATED WITH *Eucalyptus* spp. CHIP PILES,

AUTHOR: Celso Garcia Auer

ADVISER: Tasso Leo Krüger

SUMMARY

Isolations of thermophilous fungi from self-heated chip piles of eucalypt wood, with maximum temperatures ranging from 52-63°C, showed the occurrence of *Aspergillus* sp., *Dactylomyces thermophilus*, *Penicillium bacillisporum*, *Rhizomucor* sp., *Sporotrichum* sp. and *Thermoascus aurantiacus*. With exception of *D. thermophilus*, all fungi isolated from the pile were also isolated from eucalypt forest soil, air, mill waste water used for round wood washing and from water of the treatment lagoon of effluents.

The relative frequency of each thermophilous fungi isolated did not show regular distributional patterns in the sampling points and during the period of storage.

Rates of mycelial growth on potato dextrose agar at the temperatures of 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C showed the optimum temperature for growth at 30°C for *Aspergillus* and *P. bacillisporum*; 40°C for *Rhizomucor* and 50°C for *D. thermophilus*, *Sporotrichum* and *T. aurantiacus*. Growth was not at 60 and 70°C. The incubation of spores on water-agar at 20, 30, 40 and 50°C showed that only *Aspergillus*, *P. bacillisporum* and *Rhizomucor* germinate at 20°C. The optimum germination points were similar to the optimum growth point.

The effects of glucose, sucrose, starch, hydrolysate of wood and carboxymethyl cellulose (CMC) as carbon sources on mycelial growth of *Aspergillus*, *Rhizomucor* and *T. aurantiacus* were also studied. There were not significant differences among glucose, sucrose and starch, but they were significantly better than hydrolysate of wood and CMC. The inadequate growth on wood extract and CMC suggests the incapacity of these fungi to degrade hemicellulose and cellulose.

I - INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* vem sendo utilizado, no Estado de São Paulo, como principal fonte de fibras curtas para a produção de celulose e papel, em florestas de curta rotação. Deste tipo de manejo resulta a produção de madeira com grande quantidade de alburno, que facilita o ataque de microrganismos (COWLING *et alii*, 1974). A estocagem da madeira na forma de cavacos, é uma alternativa de armazenamento para futuro processamento, que pode, porém, ter implicações microbiológicas, degradadoras ou não (ESLYN, 1973 e FERRARI & KRUGNER, 1984).

Aquecimento interno em pilhas de cavacos de madeira tem sido observado em várias de celulose e papel (FOELKEL & ZVINAKEVICIUS, 1979 e LIMA *et alii*, 1980), ao qual devem estar associados vários microrganismos, dentre eles os fungos termófilos (TANSEY, 1971 e FULLER, 1985).

O presente trabalho teve por objetivos:

1. verificar a ocorrência de auto-aquecimento em pilha de cavacos de *Eucalyptus* spp., armazenada ao ar livre;
2. isolar os fungos termófilos presentes na pilha de cavacos;
3. identificar os fungos termófilos isolados;
4. estudar a distribuição dos fungos termófilos dentro da pilha de cavacos, durante o período de armazenamento e;
5. estudar o efeito da temperatura e fontes de carbono no crescimento e/ou esporulação dos fungos isolados.

II - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Armazenamento de madeira sob a forma de cavacos

A estocagem de cavacos, ao ar livre, em indústrias de celulose foi iniciada durante a década de 1950 nos EUA. Os cavacos, destinados à produção de celulose, eram resíduos de serrarias e de fábricas de aglomerados. Suas vantagens durante o manejo do material e sua economia em custos, atraíram a atenção de outros países, tais como, Canadá, Austrália, Europa e Japão, que adotaram este sistema (BERGMAN, 1972).

ESLYN (1973) comparando os dois principais métodos de estocagem de madeira, como cavacos ou como toras, afirmou que a melhor alternativa para armazenamento de madeira seria na forma de cavacos. Certos aspectos como, por exemplo,

maior facilidade no transporte do material, manejo dentro da fábrica e maior economia de espaço, apresentam-se como mais favoráveis, em relação ao uso de toras (ENGEL, 1985).

Desvantagens, também, são observadas nos pontos relacionados com o aumento no teor de finos durante o manejo dos cavacos, contaminação dos cavacos com cinzas do ar e outros agentes que causam o aparecimento de pontos pretos no papel, e maior risco de ignição espontânea na pilha. LINDGREN e ESLYN (1961) opinaram que a quantidade de madeira deteriorada, na pilha de cavacos, pode ser a mesma ou maior do que com toras.

BERGMAN *et alii* (1970) relatam que a principal vantagem do armazenamento de cavacos ao ar livre está na minimização dos custos com manejo, mas apresentando perdas substanciais de madeira, da ordem de 1% por mês de estocagem. Os autores observaram, em contraste com esta perda, maior produção de polpa celulósica, a partir de cavacos de coníferas estocadas ao ar livre, sendo devido este fato ao decréscimo no teor de extrativos da madeira.

HATTON (1970) estudando os efeitos do armazenamento com coníferas, verificou que podem ocorrer perdas na produção de celulose, com base na madeira armazenada, e redução da qualidade, além do aumento no consumo de produtos químicos durante os processos de cozimento e branqueamento. As perdas econômicas mais elevadas, segundo o autor, aconteceriam em estocagens por períodos acima de 1 ano.

Em condições atuais, a madeira destinada à produção de cavacos provém de florestas de curta rotação (SIMÕES *et alii*, 1980), as quais vão diretamente ao tambor de descascamento e ao picador.

COWLING *et alii* (1974) postulam o uso desta madeira, pois a pilha fica constituída de cavacos com alto teor de umidade, com valores ao redor de 50%, e de madeira com grande quantidade de alburno, material mais suscetível à deterioração por microrganismos e insetos. Em concordância FERNANDES (1977) estabeleceu que a madeira originada de florestas com menor idade de corte, apresenta alto conteúdo de madeira juvenil com baixa quantidade de cerne. Para folhosas, como o eucalipto, esta madeira possui maior conteúdo de lignina e composto fenólicos, com menor teor de holocelulose e extrativos, quando comparados com os valores de uma madeira de árvore adulta; possui também, menor densidade e comprimento de fibras ligeiramente inferior à madeira adulta, porém produzindo celulose de propriedades similares.

Em ensaios mais diretos, HATTON & HUNT (1972) estudaram a permanência de cavacos ao ar livre por 12 e 24 meses, utilizando *Picea glauca* e *Pinus contorta*, verificando perdas na produção de polpa celulósica, acompanhadas pelo aumento no consumo de álcalis. Os autores estabeleceram que o período de permanência deve estar restrito a períodos com menos de 12 meses. Outras consequências do armazenamento foram discutidas por BERGMAN (1972), que relacionou o decréscimo nos teores

de extrativos e resinas da madeira de coníferas, aumento da opacidade do papel que implicaria em maior consumo de produtos no braqueamento e perdas na resistência da polpa e do papel, pelo uso de cavacos com 3 a 4 meses de armazenamento ao ar livre.

2.2. Características gerais dos microrganismos termófilos

A termofilia, característica de crescimento em temperaturas acima das observadas no ambiente, relaciona-se com a capacidade genética de certos microrganismos em adaptar-se seu desenvolvimento em direção às condições extremas do ambiente (DOWDING, 1981).

A pesquisa com microrganismos termófilos, de acordo com EMERSON (1968), foi iniciada no início deste século e sua constatação em meio de cultura, foi devida à incubação de material vegetal em estufas com temperaturas acima de 40°C. Ainda segundo esse autor, foi concedido a Hugo Miehle o pioneirismo da investigação completa do fenômeno de auto-aquecimento de pilhas de feno, e pela realização dos primeiros estudos e análises do fenômeno da termofilia e associação com os microrganismos presentes. O estudo da ecologia por Noack, descreveu outros fungos, isolados novos, a partir de resíduos, tais como, esterco e restos de cultura (APINIS, 1967).

A origem da energia térmica liberada nos processos de auto-aquecimento e sua relação com a presença e ação

de microrganismos foram profundamente estudadas por vários pesquisadores (WEDBERG & RETTGER, 1941 e BARTHOLOMEW & NORMAN, 1953). De acordo com os resultados obtidos, os autores observaram modificações nas populações de microrganismos presentes, ocorrendo o surgimento de populações termófilas durante a decomposição de materiais de origem vegetal, bem como, a elevação da temperatura. Houve correlação entre os valores máximos de temperatura e aqueles de CO₂ liberados, mostrando boa probabilidade de termogênese biológica iniciar-se quando a matéria orgânica é constituída de compostos altamente energéticos (NORMAN *et alii*, 1941).

Mais tarde, COONEY & EMERSON (1964) reuniram o conhecimento adquirido até então e apresentaram a taxonomia, morfologia e biologia geral de fungos com caráter de crescimento em altas temperaturas, monografia que tem servido com auxílio à caracterização e identificação dos microrganismos. Em revisão feita por SAMSON (1981), às 13 espécies de fungos termofílicos classificadas por COONEY & EMERSON (1964) foi estendida a 50 taxons, sendo a maioria das espécies pertencentes aos fungos imperfeitos (deuteromicetos), além de encontrarmos ascomicetos e zigomicetos (mucorales). Entre os basidiomicetos, representantes são encontrados nos gêneros *Coprinus* e *Phanerochaete*.

A base do termofilismo não está completamente elucidada, pois vários pontos permanecem obscuros, principalmente aqueles referentes ao crescimento em altas temperaturas, por vezes próximas de 60°C, e o porquê da falta de crescimento em

temperaturas comuns, entre 15-25°C. EMERSON (1968) não conseguiu relacionar a termofilia e algumas estruturas presentes nas células como por exemplo, diferentes pigmentos e proporção de nucleotídeos e as características do metabolismo dos fungos termófilos. Outras hipóteses foram levantadas para explicação do fenômeno, e CRISAN (1973) baseado no conhecimento sobre membranas celulares e sua função, postulou ser a termo-estabilidade ultraestrutural, a única hipótese que poderia explicar a existência de fungos termofílicos é, que estes microrganismos teriam membranas celulares com pontos de fluidez e flexibilidade em temperaturas acima das encontradas para os fungos mesofílicos. Confirmando, SMITH (1981) afirmou que *Mucor pusillus* possui membranas particularmente estáveis em altas temperaturas, como uma possível consequência da membrana celular com estrutura modificada e que por sua vez modificaria as atividades das enzimas associadas.

Diferentes substratos podem ser utilizados durante o desenvolvimento de fungos termófilos restringindo-se, em grande parte, na decomposição de materiais orgânicos residuais nos processos de compostagem (KANE & MULLINS, 1973), em resíduos de minas de carvão na Grã-Bretanha (EVANS, 1971a), causando destruição de grãos em sistemas inadequados de armazenamento (FLANNIGAN, 1970; FLANNIGAN & SELLARS, 1972) e no armazenamento de madeira sob a forma de pilha de cavacos em fábricas de celulose (BJORKMAN & HAEGER, 1963; BERGMAN, 1972; SMITH & OFOSU-ASIEDU, 1972). A associação destes microrganismos e substratos or-

gânicos estaria ligada a processos de rápida transformação de composto lignocelulósico a compostos mais simples, devido à altas taxas do metabolismo, como parte do sistema de produção de humus (JAIN *et alii*, 1979 e KIRK & SHIMADA, 1985).

Outras ocorrências e relatos acerca de fungos termófilos tem sido relacionadas com sua presença no solo (GOCHENAUR, 1975; TANSEY & JACK, 1976 e ELLIS, 1980b), na atmosfera (EVANS, 1972; HUDSON, 1973; SANDHU & SINGH, 1985), em água aquecida proveniente de fontes geotérmicas e indústrias (TANSEY & BROCK, 1978; ELLIS, 1980a) em associação com animais e seres humanos como agente patogênicos (AINSWORTH & AUSTWICK, 1955; COONEY & EMERSON, 1964; EMERSON, 1968), resultando em alergias respiratórias, nos casos mais simples e em maior gravidade, atacando o sistema nervoso (TANSEY *et alii*, 1979 e THÖRNQUIST & LUNDSTRON, 1980).

2.3. Pilhas de cavacos de madeira com auto-aquecimento

Os primeiros trabalhos discorrendo sobre o fenômeno de auto-aquecimento em pilhas de cavacos ao ar livre, foram registrados na década de 1960. ROTHROCK *et alii* (1961) avaliando os efeitos do armazenamento de cavacos de *Pinus caribaea*, observaram temperaturas da pilha, em sua porção interna, de até 60°C nas primeiras semanas e permanência deste valor por 5 meses.

Segundo os autores, incrementos sucessivos da temperatura e a falta de relação com a temperatura ambiente, indicaram a geração de calor no interior da pilha. Temperaturas máximas de 63°C foram observadas por SOMSEN (1962) em estudos com cavacos de *Pinus* em períodos de um ano de armazenamento e em concordância com ROTHROCK *et alii* (1961) que registrou a falta de mudança na produção de polpa, bem como, aumento na demanda de álcali ativo. Os autores discutem que, de modo geral, não foram afetadas as propriedades mecânicas e físicas da polpa.

Posterioros ensaios desenvolvidos com *Quercus* sp. e *Nyssa* sp., mostraram comportamento semelhante de auto aquecimento. Pilhas de cavacos compactadas apresentaram menor deterioração, provavelmente pela menor quantidade de oxigênio disponível e as temperaturas internas não acompanharam os valores do ambiente, de modo que após 30 dias, a temperatura do centro da pilha de *Quercus* e *Nyssa* chegou a 57°C e 44°C, respectivamente (BOIS *et alii*, 1962). A análise da umidade dos cavacos indicou um gradiente na pilha, aumentando na camada mais externa e decrescendo no interior, com posterior equilíbrio em toda a pilha, após 30 dias. Houve influência de grandes precipitações pluviométricas no teor de umidade final dos cavacos. Confirmações do processo de aquecimento espontâneo em pilhas de cavacos e aspectos similares foram efetuadas por SCHMIDT (1969) e TANSEY (1971).

No Brasil, CARVALHO *et alii* (1969), em trabalho pioneiro de armazenamento de cavacos de *Eucalyptus* ao ar livre durante 7 meses, não observaram aumento da temperatura além dos valores presentes no ambiente. Por outro lado, LIMA *et alii* (1980) encontraram em operação de estocagem de *Pinus elliottii*, temperaturas máximas ao redor de 60-65°C, sem evidências de ataque intensivo às frações celulósicas e perda do rendimento em polpa, após 8 semanas de estocagem ao ar livre.

A decomposição de materiais de origem vegetal, ligada a processos termogênicos, tem sido uma consequência da degradação microbiológica de compostos solúveis. NORMAN *et alii* (1941) estudando o processo de auto-aquecimento em palha de aveia, notaram que a remoção dos constituintes solúveis em água quente induzia a queda da taxa de elevação da temperatura e que a exaustão dos compostos nutritivos do substrato causou o término da produção de calor. Houve uma taxa de elevação de calor, de acordo com os microrganismos presentes, e dois pontos máximos de calor produzidos sendo o primeiro ponto, devido à população mesófila (crescimento à temperatura ambiente) e, posteriormente o estabelecimento da população termófila. Segundo os autores, existem enormes possibilidades da termogênese microbiológica, quando a matéria orgânica é rica em energia disponível.

Acompanhando o processo de auto-aquecimento, BERGMAN (1972) afirmou que o calor liberado dentro da pilha de cavacos, é causado principalmente pela respiração de células vi

vas do alburno, dos microrganismos presentes e reações químicas de oxidação que ocorrem no interior da pilha. A respiração de células do alburno, na pilha, decorrente da utilização de madeira recém-cortada, seria responsável pelo aumento de temperatura durante os primeiros dias, com a manutenção do calor devido ao metabolismo de compostos nutritivos promovido pelo crescimento de microrganismos e o superaquecimento devido a reações oxidativas (HAJNY, 1966 e COWLING *et alii*, 1974). A ação direta dos microrganismos parece ser contraditória e mais controversa é a determinação de que grupo participa ativamente, fungos ou bactérias, explicando a elevação da temperatura nos níveis apresentados, FEIST *et alii* (1973a) discutiram que o início da termogênia é derivada da respiração celular residual da madeira e da ocorrência de bactérias, mesófilas, pois poucas colônias fúngicas foram isoladas de cavacos durante os sete primeiros dias de armazenamento. Seguindo a mesma linha de pensamento, ASSARSSON (1969) e BERGMAN (1972) relacionaram que as reservas nutricionais, na forma de amido e ácidos graxos, em células de madeira, servindo como alimento as bactérias permitiram menos danos que os fungos, apesar destes últimos possuírem uma taxa de degradação extremamente lenta. Com estes aspectos abordados, é explicada pelo número de trabalhos desenvolvidos com fungos termófilos nos estudos de populações presentes em pilhas de cavacos, seu isolamento e avaliação dos efeitos sobre a madeira atacada (BERGMAN *et alii*, 1970; BERGMAN & NILSSON 1971; OFOSU-ASIEDU &

SMITH, 1973a). SMITH (1975) afirmou que os fungos termófilos , associados a madeira, possuem como características principais , a falta de crescimento em temperatura ambiente, vivendo entre 37,8 - 60°C, quando a temperatura da pilha e a alta umidade dos cavacos fornecem um habitat ideal para crescimento. Embora não existam evidências de que possam degradar a lignina, utilizam a celulose, hemicelulose e extrativos como fonte de energia (FERGUS, 1969 e ROSENBERG, 1978).

A presença de reações químicas de auto-oxidação e termogênese mostraram vários efeitos na qualidade da madeira para a celulose, encontrados por FEIST *et alii* (1973b) analisando cavacos obtidos de madeira recém-cortada de *Populus tremuloides* e *Pseudotsuga menziesii*, pasteurizados (76 a 78°C por 48 horas) e conservados por 3 meses a 65°C. Foram registradas perdas na produção de polpa ao redor de 21 a 23°C, além do maior requerimento de alcális, maior teor de rejeitos na fábrica e decréscimo das propriedades físicas e químicas da polpa na faixa entre 10 e 35%. KUBLER (1982b) postulou que pequenas quantidades de oxigênio nas cavidades celulares e entre cavacos de madeira poderiam reagir com compostos, gerando calor em lentas oxidações internas e causar o aquecimento da pilha. O autor somente observou a proporcionalidade entre a geração de calor e a temperatura da pilha, apesar das condições da pilha apresentarem normalmente total perda de calor para o ambiente . O baixo nível de oxigênio no interior da pilha foi atribuído, principal

mente, ao consumo microbiológico, tendo como consequência a produção de calor. O consumo do oxigênio disponível aos organismos vivos e a oxidação química direta, deixaria o oxigênio residual, de pouco efeito na liberação de calor.

A importância do armazenamento de cavacos ao ar livre e a ocorrência de auto-aquecimento estaria relacionada com os principais problemas para a indústria, tais como, perdas em madeira e produção de polpa com base na quantidade armazenada, na qualidade da polpa produzida e aumento de consumo durante a polpação e/ou produtos químicos durante o branqueamento da celulose (HULME & HATTON, 1976a). Contudo, avaliando-se a fisiologia dos microrganismos termófilos, foi notado que a termogênese biológica causou queda no teor de extrativos e segundo HATTON (1970) o grau ou facilidade da remoção de lignina de *Picea* parece aumentar com o período de armazenamento prolongado, fato explicado por OFOSU-ASIEDU & SMITH (1973b) que sugeriram a capacidade de degradar os extrativos fenólicos e a lignina. A produção de limo, caracterizada pela aglomeração da biomassa de microrganismos e resíduos de resinas e gomas durante as etapas de produção de celulose e papel, discutida por ANGELIS & SGA-GLIA (1980) poderia ser incrementada pela presença de fungos e bactérias que atravessando o processo de cozimento, chegariam até a polpa e o papel (EVELEIGA & BREMER, 1963). Porém, BERGMAN (1972) postulou que o consumo de certos extrativos, ácidos gra-

xos insaturados e outros compostos insaponificáveis poderiam le
var à diminuição de lımo formado, e consequentemente aumento na
qualidade de polpa produzida.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Montagem, monitoramento da pilha e coleta de cavacos de eucalipto.

A montagem da pilha de cavacos de madeira, no pátio da fábrica da Champion Papel e Celulose S/A, em Mogi Guaçu, SP., seguiu a metodologia utilizada pela mesma, onde são construídas, praticamente, duas pilhas de cavacos. Existe uma pilha maior, de forma trapezoidal (vista sob corte longitudinal) com volume estimado entre 25.000 e 30.000 m³ de cavacos, servindo como base para outra pilha de forma cônica de volume bem inferior e muito variável, de acordo com o consumo indus-

trial. A pilha maior mantém o cavaco armazenado por 4 a 5 meses, enquanto que a pilha menor superposta abastece os digestores industriais da fábrica durante este período. Foi destinada ao estudo a pilha maior, pelo fato de permanecer mais tempo sob a influência do ambiente e dos microrganismos. Esta começou a ser construída em 09.06.84, sendo completada no dia 15.06.84, e mantida até fim de outubro/84, época em que se iniciou o consumo final dos cavacos. A pilha foi terminada em 05.11.84.

A madeira utilizada, para a montagem da pilha, constou de uma mistura de espécies (*Eucalyptus grandis*, *E. saligna* e outras), sendo seus percentuais de participação volumétrica descritos na Tabela 1, a partir de dados fornecidos pela fábrica. Da tórã até a forma de cavacos, a madeira passou pelos processos de lavagem com águas servidas do licor do cozimento, descascamento, picagem e transporte por esteira até o pátio de armazenamento. Os cavacos utilizados na montagem da pilha apresentaram diferentes espessuras, caracterizadas por uma faixa percentual do total da pilha, com seus valores apresentados na Tabela 2. De acordo com informações prestadas pela fábrica, a utilização deste sistema condicionava a reduções no teor de rejeitos, bem como melhor eficiência de cozimento para produção de celulose.

Tabela 1 - Relação das espécies de *Eucalyptus* e sua participação em volume (%), na montagem da pilha de cavacos de madeira em Mogi Guaçu.

Espécie	Participação em volume (%)*
<i>E. saligna</i>	56,3
<i>E. grandis</i>	42,1
Outras**	1,6

* - Cerca de 84,2% da madeira é de 1ª rotação, com idade média ponderada igual a 8,1 anos.

** - Incluem-se as espécies recebidas pela fábrica em menor quantidade: *E. urophylla*, *E. robusta*, etc.

Tabela 2 - Caracterização da espessura (mm) dos cavacos em faixas percentuais, produzidos pelo picador para a montagem da pilha de cavacos em Mogi Guaçu.

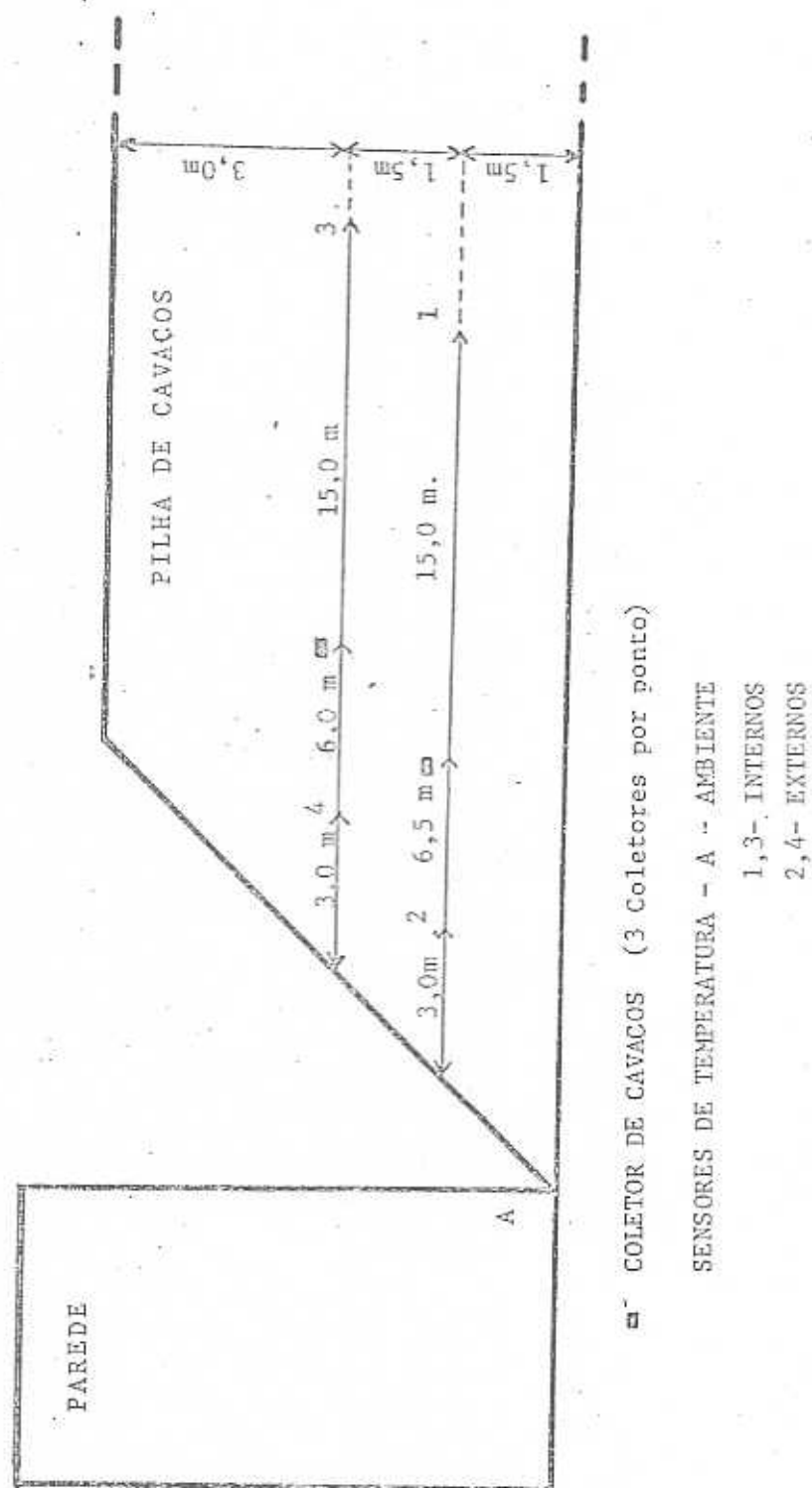
Espessura do cavaco (mm)	Faixa percentual na pilha(%)
abaixo de 4	80-85
entre 4 e 6	11-14
entre 6 e 8	3-5
acima de 8	0-12

Nas fases iniciais da montagem da pilha, foram demarcados os pontos para a amostragem inicial e mensal do armazenamento, visando a coleta de cavacos e medição das temperaturas internas e externa.

O monitoramento da pilha fixou-se na determinação dos parâmetros em apenas um setor, pelo fato de que o aumento do número de pontos de amostragem levaria a um conflito com as atividades da indústria durante as operações de abastecimento.

A determinação de temperaturas foi obtida pelo uso de termopares de ferro-constantan, ligados a um registrador de temperatura digital de fabricação nacional, marca ICOS. Os termopares inseridos dentro de um tubo galvanizado, de modo que os fios elétricos não ficassem em contato com os cavacos, sendo todo o conjunto colocado na pilha, durante a montagem da pilha. O registrador de temperatura permaneceu do lado de fora da pilha, no qual foram efetuadas as leituras, às 3 horas da manhã, das temperaturas presentes na pilha e no ambiente externo, e cuja disposição é mostrada pela Figura 1.

A precipitação mensal foi registrada, sendo os dados fornecidos pela Champion, através de medições locais efetuadas em pluviômetros pertencentes à empresa.



□ COLETOR DE CAVACOS (3 Coletores por ponto)

SENORES DE TEMPERATURA - A - AMBIENTE

1, 3- INTERNOS

2, 4- EXTERNOS

FIGURA 1 - Disposição dos coletores de cavacos e sensores de temperatura na pilha de cavacos de

Eucalyptus.

Os coletores de cavacos constaram de recipientes construídos com tela de ferro e chapa de aço em formato cilíndrico, tendo a parte anterior aguda, onde soldou-se uma argola de ferro para tracionamento com cabos de aço, quando da sua retirada da pilha. O coletor possuía em sua parte posterior uma abertura, com tampo parafusado, para a colocação e retirada dos cavacos. Estes amostradores, em números de seis, foram preenchidos com 10 Kg de cavacos e colocados dentro da pilha, prevendo-se a retirada de 2 por mês. O coletor delineado conforme a Figura 2 foi baseado em estudos relacionados com a estocagem de cavacos ao ar livre (BJÖRKMAN e HAEGER, 1963; TANSEY, 1971; SMITH & OFOSU-ASIEDU, 1972). Os cavacos coletados foram acondicionados em sacos plásticos de polietileno e fechados para se evitar a perda de umidade e rapidamente despachados ao laboratório do Depto. de Ciências Florestais (determinações físicas) e o laboratório de Fitopatologia (determinações microbiológicas) da ESALQ/USP.

A determinação da umidade foi efetuada pela pesagem prévia dos cavacos úmidos, secagem em estufa a temperatura de $103 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 12 horas, no mínimo, e posterior pesagem, obtendo-se a umidade percentual pela seguinte fórmula:

$$U\% = \frac{P_u - P_s}{P_u} \times 100$$

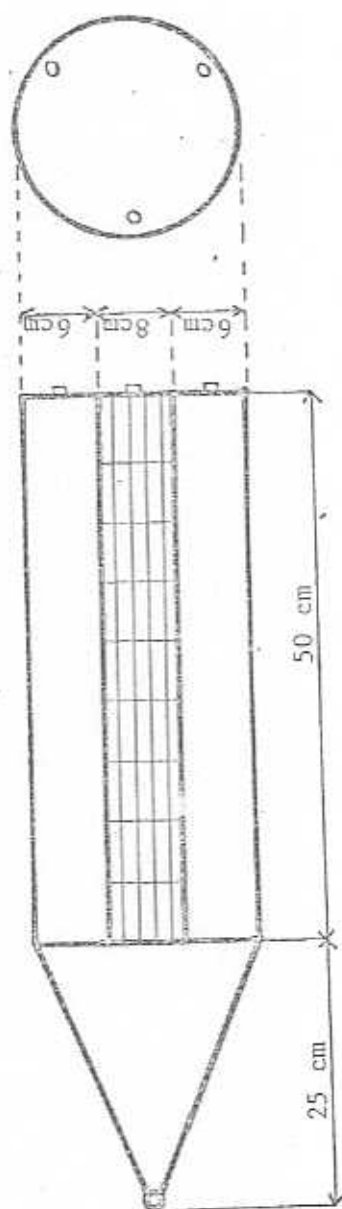


FIGURA 2 - Coletor de cavacos de *Eucalyptus* utilizado na amostragem da pilha, durante o período de armazenamento ao ar livre.

onde:

P_u = peso dos cavacos úmidos (g)

P_s = peso dos cavacos secos (g)

A obtenção dos valores de pH dos cavacos coletados foi baseada e adaptada dos trabalhos de HULME e HATTON (1976b). Pesou-se 100 g de cavacos úmidos, que foram colocados em um frasco de Erlenmeyer de 500 ml, juntamente com 200g de água destilada de pH entre 6,0-6,5. Todo o conjunto foi colocado em agitação, por uma hora, sendo o líquido filtrado e feita a medição dos valores em peagâmetro digital.

3.2. Atividades conduzidas no laboratório

3.2.1. ENSAIO 1 - Teste com diferentes meios de cultura pura para isolamento de microrganismos termófilos.

Cavacos de eucalipto foram coletados no dia 06.04.84, a partir de uma pilha da fábrica, anterior à destinada para os estudos da distribuição dos microrganismos, visando-se testar o método de isolamento. Da pilha de cavacos com auto-aquecimento, com 4 meses de armazenamento ao ar livre, retiram-se cavacos de locais onde a temperatura registrada foi igual ou acima de 40°C , na profundidade entre 1,0 - 1,5 m da superfície da pilha.

A técnica de isolamento utilizada foi a de implantação de tecidos internos do cavaco em meio de cultura. Após esterilização externa dos cavacos, pela flambagem com álcool (imersão em álcool 92°G.L. e queima), foram extraídos tecidos com dimensões em torno de 2 - 3 mm de espessura e largura, com 8 - 10 mm de comprimento. De cada cavaco, retiraram-se 3 partes do tecido interno, uma para cada meio de cultura, sendo distribuídas 4 partes por placa de Petri, perfazendo cada meio 25 placas, totalizando a amostragem de 100 cavacos, ao acaso.

Os meios de cultura empregados para o ensaio, extraídos de BOOTH (1971), foram meio BDA (extrato de 200 g de batata; dextrose, 20 g; ágar-ágar, 18 g e água destilada q.s.p. 1000 ml), nutriente-ágar (NA) (peptona comercial, 5,0 g; extrato de carne, 3,0 g; ágar-ágar, 18 g e água destilada q.s.p. 1000 ml) e meio de Martin modificado (peptona comercial, 15 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; K_2HPO_4 , 1,0 g; rosa bengala, 0,035 g; sulfato de estreptomicina, 1:10.000; dextrose, 10 g; ágar-ágar, 20 g e água destilada q.s.p. 1000 ml).

As placas inoculadas foram colocadas para incubação em estufa controlada para 50°C e mantidas por 48 horas, sendo posteriormente efetuada a determinação da frequência de microrganismos isolados.

3.2.2. ENSAIO 2 - Comparação entre BDA e hidrolisado de madeira-ágar para isolamento de fungos termófilos.

Como meio de isolamento foram utilizados o meio BDA, de composição idêntica ao Ensaio 1, hidrolisado de madeira-ágar (MA). O licor de madeira resultou do cozimento de cavacos de eucalipto em água destilada a 170°C, obtendo-se um extrato de madeira com 86,8% de açúcares totais (método fenólsulfúrico) após neutralização com NaOH 1N, pH igual a 7,0.

O meio HMA foi elaborado pela adição de ágar a um volume do extrato, correspondente a 20 g de açúcares totais(hidrolisado de madeira, 230 ml; ágar-ágar, 18 g e água destilada q.s.p. 1000 ml).

Partindo-se de cavacos coletados na saída do picador e de cavacos do mesmo lote do Ensaio 1, foram separados 100 cavacos ao acaso. De cada cavaco foram retirados dois pedaços de tecido, sem esterilização superficial, e colocados cada pedaço em um meio de isolamento. Todo o conjunto foi incubado em estufa controlada a 50°C por 48 horas, sendo posteriormente efetuada a identificação dos fungos e sua frequência nos cavacos amostrados.

3.2.3. Isolamento de fungos termófilos a partir dos cavacos coletados da pilha.

O material coletado na fábrica e transportado em sacos plásticos foi prontamente processado, sendo as amostras coletadas e não analisadas, conservadas em câmara fria a 12°C.

A metodologia para isolamento constou de dois tipos, com e sem esterilização externa (Ensaio 1 e 2).

O primeiro lote de cavacos coletado para isolamento, constituiu-se de cavacos recém-picados, retirados dos pontos de amostragem da temperatura durante a construção da pi

4.3. Identificação dos fungos isolados

Os fungos termófilos, isolados a partir de cavacos de madeira de *Eucalyptus*, foram identificados de acordo com as características apresentadas a seguir:

. *Aspergillus* sp

Colônias flocosas, em BDA, de cor verde-claro a 20°C escurecendo com o aumento da temperatura, apresentando-se verde-oliva a 50°C, micélio hialino, com conidióforos apresentando alongamento no ápice e vesículas terminais com fiálides produzindo grande quantidade de conídios (ONIONS *et alii*, 1981). Não foi encontrada a fase perfeita do fungo.

A descrição de *A. fumigatus*, isolado e identificado por EVANS (1971b), se aproxima das características apresentadas pelos isolados obtidos.

. *Dactylomyces thermophilus* Sopp. *sensu* Apinis

Colônias cremes, em BDA, tornando-se alaranjadas a vermelho-tijolo com a idade. Forma conidial tipo *Pascilomyces*, com reduzido número de fiálides no conidióforo. Ascocarpos tipo cleistotécio abundantes, livres ou confluentes. Ascos evanescentes, com ascosporos, geralmente em número de 8 por asco (APINIS, 1967).

O material isolado se assemelha à descrição de talhada de APINIS (1967), apesar de COONEY & EMERSON (1964) incluírem esta espécie dentro de *Thermoascus aurantiacus*. Entretanto, as formas conidiais distintas e estruturas do ascocarpo, indicam que a proposição de APINIS (1967) está mais próxima da realidade.

. *Penicillium bacillisporum* Swift

Colônias creme, em BDA, de aspecto flocoso numa camada muito fina. Micélio hialino, do qual se originam inúmeros penicílios curtos, hialinos, eretos, septados, do tipo simétrico, cujas fiálides produzem conídios em cadeias longas e paralelas (STOLK & SAMSON, 1972). Ascocarpos não foram observados em qualquer das temperaturas estudadas.

. *Rhizomucor* sp.

Colônias cinza, em BDA, com leve tom castanho, até 1 cm de altura, de aspecto cotonoso. Esporangióforos monopodialmente ramificados, com tendência de apresentar maior número de ramificações e esporângios, próximo à região apical. Columelas observadas, panduriformes ou ocasionalmente esféricas. Esporos esféricos, zigospores, não sendo registrada a fase perfeita e consequente produção de zigospores (SCHIPPER, 1978).

O gênero é distinto de *Mucor* pela formação de estolões e rizóides, de *Rhizopus* pela produção de esporangióforos repetidamente ramificados, além da natureza termofílica que delimita este gênero.

. *Sporotrichum* sp.

Colônias brancas, em BDA, de aspecto cottonoso em camada fina, passando a escurecer o reverso da placa, com a idade. Micélio hialino com grande quantidade de conídios, originados diretamente do micélio, em fiálides ou esterigmas individuais ou conidióforo único ou irregularmente ramificados. As fiálides variam de muito curtas até esporos quase sésseis (COONEY & EMERSON, 1964). Não foi encontrada a fase perfeita.

. *Thermoascus aurantiacus* Miede sensu Apinis

Colônias esbranquiçadas no início, em BDA, tornando-se escuras quando providas de ascocarpos. Fase conidial tipo *Aphanoascus*. Conidiosporos, clavados ou obovados, desenvolvidos terminalmente em ramificações de hifas. Ascocarpos tipo cleistotécio, isolados ou confluentes, marron a marron-escuro, abundantes. Ascos geralmente esféricos evanescentes, com ascosporos em número de 8. (APINIS, 1967).

Preferiu-se a nomenclatura utilizada por APINIS (1967) por ser mais consistente, pois COONEY & EMERSON (1964) apresentaram outra nomenclatura que abrange duas espécies pertencentes a dois gêneros diferentes.

V - DISCUSSÃO

5.1. Monitoramento da pilha de cavacos

O fenômeno de auto-aquecimento em pilhas de cavacos de madeira, ocorre normalmente, em fábricas de celulose e papel, sendo relacionado com a presença de madeira recém-cortada apresentando alto teor de umidade e células do alburno ainda vivas, ação de microrganismos degradadores de compostos celulares armazenados e reações de auto-oxidação originadas durante o período de estocagem (FULLER, 1985). Este aquecimento, registrado dentro do primeiro mês de monitoramento da pilha de cavacos de eucalipto, mostrou incrementos de temperatura maiores nos pontos mais internos da pilha e manutenção posterior da temperatura na faixa entre 40-60°C (Tabela 4). Desse modo, são várias possibilidades para termogênia estar relacionada a processos respiratórios, haja visto que a madeira era recém-corta-

da, com teor de umidade dos cavacos de 41% e microrganismos termófilos presentes nos cavacos recém-picados (Tabela 6, 10 e 11). Provavelmente, a energia liberada pela respiração forneceu condições para o desenvolvimento de microrganismos mesófilos consumidores das reservas de madeira (ASSARSSON, 1969) produzindo condições de temperatura, suficientes, para a sucessão e crescimento dos termófilos sobre os cavacos. As flutuações de temperatura e abaixamento do valor do pH (Tabelas 4 e 7) seriam causadas, entre outros fatores, por mudanças no número e tipo de microrganismos presentes na pilha (ZUCH *et alii*, 1976).

A observação dos períodos de precipitação e seus efeitos na temperatura da pilha (Figura 3), mostrou que as camadas mais externas são sensíveis às mudanças de ambiente, com KUBLER (1982b) acrescentando o fato da pilha produzir calor porém dissipando-o, sendo totalmente perdido para o ambiente. KUBLER (1982a) ressalta, também, que se por um lado o efeito "chaminé" de ar úmido e quente em pilhas de cavacos fornecendo oxigênio aos sistemas respiratórios (células do alburno e microrganismos), por outro lado retira calor e umidade na forma de correntes de convecção, para fora da pilha.

5.2. Isolamento de fungos termófilos

Com base nos isolamentos efetuados, com cavacos da pilha, foram obtidos seis gêneros com três espécies des-

critas. Nota-se ser um grupo muito restrito, em comparação com o número de fungos isolados por BERGMAN *et alii* (1970) e TANSEY (1971). Quanto a frequência relativa de cada fungo, foram observados em maior frequência *Aspergillus* e *Sporotrichum*, porém tal como os outros fungos, sem apresentar um padrão definido de distribuição durante o período de estocagem. Segundo SMITH & OFOSU ASIEDU (1972) a distribuição dos fungos na pilha é afetada pela temperatura, período de armazenamento e posição para amostragem sem efeito significativo do pH e teor de umidade dos cavacos. A esterilização externa dos cavacos resultou no aumento da frequência de *T.aurantiacus*, mostrando um provável antagonismo entre fungos termófilos descrito por JODICE *et alii* (1974) ou indicação da capacidade de penetração na madeira, já que houve crescimento a partir de tecidos internos, retirados dos cavacos.

Pontos próximos da fábrica e camadas superficiais do solo de formações florestais de eucalipto demonstraram ser possíveis fontes para contaminação e inoculação da pilha de cavacos (Tabela 15). *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes, tendo sido isolados de solo, ar e águas residuais com *D.thermophilus* não isolado em nenhum destes pontos.

As observações efetuadas em solo de floresta concordam com trabalhos de WARD & COWLEY (1972) e TANSEY & JACK (1976), no sentido dos fungos ocorrerem no solo de floresta em concentração de propágulos normalmente baixa. O método adotado para coleta simples de esporo do ar, demonstrou somente

a presença de termófilos no ar (UPSHER, 1985), *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *P.bacillisporum* e *T. aurantiacus*, já encontrados por outros autores (EVANS, 1972; HUDSON, 1973 e SANDHU & SINGH, 1985). O calor presente em águas residuais aquecidas é suficiente para manter habitats para crescimento e propágulos de fungos termófilos (ELLIS, 1980a), Estes propágulos foram observados na água de lavagem de toras e da lagoa de efluentes e podem servir de fonte de inóculo dos termófilos, para a pilha de cavacos.

O presente trabalho de pesquisa desenvolvido, provavelmente, é o primeiro que relaciona o fenômeno da termogênese em pilha de cavacos de *Eucalyptus* ao ar livre, com a ação de fungos termófilos, no Brasil. Estudos iniciais com cavacos de eucalipto desenvolvidos por CARVALHO *et alii* (1969) não constataram auto-aquecimento na pilha e relacionaram, apenas, fungos de caráter mesofílico durante 7 meses de estocagem, e FOELKEL & ZVINAKEVCIUS (1979) determinaram a influência de cavacos deteriorados, provenientes de pilha com auto-aquecimento, nas propriedades da celulose kraft sem isolar e quantificar a população de microrganismos associada ao processo.

5.3. Crescimento de fungos termófilos em diferentes temperaturas.

A temperatura ótima de crescimento encontrada para os fungos estudados, em meio de BDA, (Tabelas 16 a 21) apresentou-se similar a ensaios de autores com meios de cultivo

diferentes. CHAPMAN (1974) utilizando extrato de levedura-amido-ágar complementado com sais minerais, encontrou taxas de crescimento para fungos mucoráceos e *Sporotrichum* a 40°C, não confirmando totalmente os valores encontrados (Tabela 19). Para os outros fungos, foram observadas pequenas diferenças, com relação às temperaturas registradas por ROSEMBERG (1975) que concordando com CRISAN (1973) afirma serem estas diferenças devidas à especificidade do isolado e a presença de grandes quantidades de aminoácidos e a açúcares no meio de cultura, que induziriam a repressões na síntese ou inibição de enzimas. Por outro lado, em conjunto com o substrato e quantidade de oxigênio disponível a temperatura exerce grande efeito no crescimento e tipo de esporulação de fungos termófilos, o que explicaria a ausência da fase perfeita de *Rhizomucor* e *P.bacillisporum* em meio BDA (DE PLOEY & FERGUS, 1975 e DEPLOEY, 1985).

Na discussão do caráter termófilo de crescimento, COONEY & EMERSON (1964) postularam que fungos termófilos são aqueles microrganismos com um mínimo de temperatura requerido para crescimento (20°C ou mais) e temperaturas máximas de 50°C ou acima, colocação abrangente que incluiria certos mesófilos com variação grande nos extremos de temperatura. CRISAN (1964) citado por EMERSON (1968) cita a termófilia como sendo característica de microrganismos com ótimos de temperatura em 40°C ou mais, diferenciando sensatamente, esta classe de microrganismos. Com base nestes autores, *D.thermophilus*, *Rhizomucor*,

Sporotrichum e *T. aurantiacus* seriam considerados termófilos e considerar-se-iam *Aspergillus* e *P.bacillisporum* como mesofílicos termotolerantes. Foi discutido por vários autores, a necessidade da determinação exata do ótimo de temperatura, pois têm sido relatado, em geral, uma queda brusca no crescimento de termófilos em temperatura logo acima do ponto ótimo (EMERSON, 1968 & ROSEMBERG, 1975). Este fato foi confirmado com *D.thermophilus*, *Rhizomucor*, *Sporotrichum*, *T. aurantiacus* que mostraram ótimo crescimento a 50°C, e ausência de crescimento a 60 e 70°C.

5.4. Germinação de esporos de fungos isolados em diferentes temperaturas.

A análise do efeito da temperatura sobre a germinação dos esporos indicou estreito relacionamento da temperatura e o menor período latente de germinação (Tabela 22). A exceção de *Sporotrichum* que germinou somente a 30°C, todos os fungos demonstraram menor tempo para lançamento do tubo germinativo, em temperaturas próximas da temperatura ótima de crescimento. *Aspergillus*, *P.bacillisporum* e *Rhizomucor* possuíram capacidade de germinar a 20°C participando, possivelmente, dos processos iniciais de termogênese biológica, enquanto *D.termophilus*, *Sporotrichum* e *T.aurantiacus* participariam do processo de auto-aquecimento, no instante em que a temperatura atingisse a capacidade germinativa dos esporos (COCHRANE, 1958).

5.5. Crescimento de fungos isolados em algumas fontes de carbono.

Diferentes fontes de carbono produziram comportamento diferenciado na taxa de crescimento de *Aspergillus*, *Rhizomucor* e *T.aurantiacus*, quando analisadas as taxas de crescimento (Tabela 23). O crescimento de *Rhizomucor* foi o melhor em todos os tratamentos, fato relacionado com a temperatura de 40°C adotada para o ensaio (ponto ótimo para este fungo). O amido foi a fonte de carbono de maiores taxas de crescimento, com pequenas diferenças de dextrose, sacarose e da testemunha, e diferenças significativas destes com hidrolisado de madeira e carboximetil celulose, mostrando efeitos negativos no desenvolvimento dos fungos e estabelecimento de uma possível inibição ao crescimento pois os valores médios estão abaixo dos registrados com a testemunha (sem fonte de carbono).

O consumo de compostos armazenados nas células da madeira pode estar ligado às preferências nutricionais dos fungos estudados (OBERT, 1979), pois dextrose, sacarose e amido estão normalmente presentes em células vegetais (BERGMAN, 1972) e fazem parte da fração de extrativos da madeira. A composição do hidrolisado de madeira não foi determinada, mas admite-se compostos hemicelulósicos, substâncias pecticas, proteínas e lipídeos, pela ação da temperatura e pressão durante o cozimento (EIRA, 1975). A fração pectica é composta, principalmente, de plímeros de vários açúcares: galactose, ácidos urônicos, ram

nose, furanose, arabinose e piranose (ASPINALL, 1970), e as hemiceluloses de xiloglucanas e outros açúcares, tais como, xilanas glocomananas, mananas e galacturonanas (ALBERSHEIM *et alii*, 1973), componentes da madeira que segundo FLANNIGAN & SELLARS (1972) são consumidos por algumas espécies de *Aspergillus*, enquanto que *Rhizomucor* e *T. aurantiacus* apresentaram baixa atividade enzimica contra estes substratos. Explica-se assim, a seleção de fungos observada quando do hidrolisado de madeira como meio para isolamento (Tabela 10) e menor taxa de crescimento , em comparação com BDA (Tabelas 16 a 21 e 24).

A ação celulotica de fungos termófilos, enfatizada por HULME e HATTON (1976b) e ROSEMBERG (1978) não foi detectada, como reflexo da baixa utilização de carboximetil celulose como fonte de carbono e sendo este um composto mais simples do que a celulose bruta e postula-se que os mesmos fungos não teriam capacidade celulolítica (FERGUS, 1969 e OSO, 1978) . Esta ação, também, não foi confirmada por ADAMS & DEPLOEY (1978) e FERRARI (comunicação pessoal) trabalhando com fungos termófilos isolados de fábricas de celulose, não sendo constatado o ataque a frações celulósicas dos cavacos, pois houve produção normal de celulose quando a madeira foi originária da pilha com auto-aquecimento (TESSER, comunicação pessoal).

VI - CONCLUSÕES

Em concordância com os resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se tirar as seguintes conclusões:

- 1 - A pilha de cavacos de eucalipto apresentou auto-aquecimento, com temperaturas ultrapassando 50°C, dentro das três primeiras semanas e mantendo-se elevadas até o final de 5 meses de estocagem.
- 2 - O meio elaborado com hidrolisado de madeira foi pior que o meio BDA para isolamento e cultivo de fungos termófilos.
- 3 - Os fungos isolados, a partir de cavacos retirados da pilha, foram identificados como *Aspergillus* sp., *Dactylomyces thermophilus*, *Penicillium bacillisporum*, *Rhizomucor* sp., *Sporotrichum* sp. e *Thermoascus aurantiacus*. Foi registrada a presença

dos mesmos fungos isolados da pilha de cavacos, com exceção de *D.thermophilus*, em solos de florestas de *Eucalyptus*, em águas residuais para lavagem de toras e da lagoa de tratamento de efluentes.

- 4 - As frequências relativas de cada fungo, não mostraram um padrão definido de ocorrência em função dos pontos amostrados, e no decorrer do período de armazenamento.
- 5 - Os fungos estudados são cosmopolitas, porém em menor número quando comparados com o relato de outros países.
- 6 - As temperaturas ótimas de crescimento estudadas foram: 30°C para *Aspergillus* sp. e *P.bacillisporum*; 40°C para *Rhizomucor* sp. e 50°C para *D.thermophilus*, *Sporotrichum* sp., e *T.aurantiacus*. A 60 e 70°C não houve crescimento, em meio BDA, dos fungos isolados.
- 7 - Dos fungos estudados, somente *Aspergillus* sp., *P.bacillisporum* e *Rhizomucor* sp. apresentaram germinação de esporos (conídios) a 20°C em ágar-água. Os pontos ótimos de germinação dos conídios se aproximaram dos pontos ótimos de crescimento micelial.
- 8 - Não houve diferenças significativas entre dextrose, sacarose e amido como fontes de carbono para crescimento de *Aspergillus* sp. e *T.aurantiacus*, porém foram significativamente superior ao hidrolisado de madeira e carboximetil celulose. Estes fungos não apresentaram crescimento adequado em meio com hidrolisado de madeira e carboximetil celulose como fontes de carbono, sugerido sua incapacidade de degradar hemicelulose e celulose.

VII - LITERATURA CITADA

ADAMS, P.R. & J.J. DEPLOY, 1978. Enzyme produced by thermophilic fungi. *Mycologia*. New York, 70:906-910.

AINSWORTH, G.C. & P.K.C. AUSTWICK, 1955. A survey of animal mycoses in Britain: Mycological aspects. *Transactions of the British Mycological Society*. London. 38:369-386.

ALBERSHEIM, P.; W. BAUER; K. KEEGSTRA & W. TALMADGE, 1973. The structure of the wall of suspension cultures sycamore cells. In: F. Loevres (ed.). *Biogenesis of plant cell wall polysaccharides*. London, Academic Press. p. 149-164.

- ANGELIS, D.F. & M. SCAGLIA, 1980. "Slime". Algumas considerações sobre a sua natureza microbiológica. In: XIII Congresso Anual da ABCP - Trabalhos técnicos, São Paulo, 24 a 28 novembro de 1980. p. 111-114.
- APINIS, A.E., 1967. *Dactylomyces* and *Thermoascus*. Transactions of the British mycological society. London, 50:573-582.
- ASPINALL, G.O., 1970. The carbohydrates: chemistry and biochemistry. W. Pigmon e D. Horton (ed). Vol. II B, 2ª ed. London, Academic Press. p. 515-536.
- ASSARSSON, A., 1969. Some reactions during chip storage and how to control them. Pulp and Paper Magazine of Canada. Westmount, 70:74-79.
- BARTHOLOMEW, W.V. & A.G. NORMAN, 1953. Microbial thermogenesis in the decomposition of plant materials. IV. Influence of moisture content and of initial temperature. Journal of Bacteriology. Baltimore, 65:228-232.
- BERGMAN, U., 1972. Deterioration and protection of wood chips in outside chip storage. In: Symposium on production handling and transport of wood chips. FAO/NORAD, Hurdal, Norway 13 aug. - 8 sept. 1972. Roma, FAO. p. 267-287.

- BERGMAN, O & T.NILSSON, 1971. Studies on outside storage of sawmill chips. Research Notes. Stockholm, R. 71, 54 p.
- BERGMAN, O, ; T. NILSSON & P. JERKEMAN, 1970. Reduction of microbial deterioration in outside chip storage by alkali treatment. Svensk Papperstidning, Stockholm, 73: 653-666.
- BJÖRKMAN, E. & C.E. HAEGER, 1963. Outdoor storage of chips and damage by microorganisms. Tappi. Atlanta, 46:129-133.
- BOIS, P.J.; R.A. FLICK & W.D. GILMER, 1962. A study of outside storage of hard wood pulp chips in the southeast. Tappi. Atlanta, 45:609-618
- BOOTH, C., 1971. Fungal culture media. In: C. Booth (ed.). Methods in microbiology. London and New York, Academic Press, Vol. IV, Cap. 2, p. 49-94.
- BROCK, T.D. & A.W. ROSE, 1969. Psychrophiles and thermophiles. In: J.R. Norris e D.W. Ribbons (ed). Methods in microbiology. London and New York, Academic Press. Vol. III B, cap. 7, p.161-8.

- CARVALHO, P.C.T.; T.L. KRUGNER; A.P.M. GALVÃO & A.S.R. COELHO, 1969. Estudos sobre o armazenamento de cavacos de *Eucalyptus* spp. ao ar livre. Congresso Florestal Argentino, 1, Buenos Aires, 6-11 outubro 1969. Buenos Aires, Serviço National Forestal. p. 649-668.
- CHAPMAN, E.S., 1974. Effect of temperature on growth rate of seven thermophilic fungi. *Mycologia*. New York, 66:542-546.
- COCHRANE, V.W., 1958. *Physiology of fungi*. W.H. Freedman and Company, San Francisco. 183 p.
- COONEY & ENGLISH, 1964 ?
- COWLING, E.B.; W.L. HARLEY & J. WEINER, 1974. Changes in value and utility of pulpwood during harvesting, transport and storage. *TAPPI*. Atlanta, 57:120-123
- CRISAN, E.V., 1973. Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia*, New York, 65: 1171-1198.
- DEPLOEY, J.J., 1985. The influence of atmosphere composition and nutrients on the germination of *Rhizomucor pusillus* sporangiospores. *Mycologia*. New York, 77:97-102.
- DEPLOEY, J.J. & C.L. FERGUS, 1975. Growth and sporulation of thermophilic fungi and actinomycetes in O₂-N₂ atmospheres. *Mycologia*. New York, 67:780-797.

- DOWDING, P., 1981. What is a extreme environment to a fungus?
In: Fungi in Extreme Environments. Cambridge, Cambridge
University Press. Bulletin of the British Mycological Society.
Vol. 15. Supplement 2. 28p.
- EIRA, A.F., 1975. O problema de acumulações limosas de origem
microbiana em indústrias de chapas de fibras da madeira.
Piracicaba, ESALQ/USP. 80p. (Dissertação de Mestrado).
- ELLIS, D.H., 1980a. Thermophilic fungi isolated from a heated
aquatic habitat. Mycologia, New York, 72: 1030-1033.
- ELLIS, D.H., 1980b. Thermophilous fungi isolated from some
antartic and sub-antartic soils. Mycologia, New York, 72:1033-
1036.
- EMERSON, R., 1968. Thermophiles. In: AINSWORTH, G.C. & A.S.
SUSSMAN, Coord. The fungi - An Advanced Treatise, v. III. New
York, Academic Press. p. 105-128.
- ENGEL, V.L., 1985. Obtenção de cavacos de madeira. Piracicaba.
ESALQ/USP. Departamento de Silvicultura, 18 p. (mimeografado).
- ESLYN, W.E., 1973. Evaluation chemicals for controlling
biodegradation of stored wood chips. Forest Products Journal.
Madison, 23:21-25.

- EVANS, H.C., 1971a. Thermophilous fungi of coal spoil tips.
I. Taxonomy. Transactions of the British Mycological Society.
London, 57:241-254.
- EVANS, H.C., 1971b. Thermophilous fungi coal spoil tips.
II. Occurrence, distribution and temperature relationships.
Transactions of the British Mycological Society. London,
57: 255-266.
- EVANS, H.C., 1972. Thermophilous fungi isolated from the air.
Transactions of the British Mycological Society. London,
59:516-519.
- EVELEIGH, D.E. & D. BREWER, 1963. Studies on slime
accumulations in pulp and paper mills. VI. Isolation of
thermophilic and thermotolerant fungi from paper mills.
Canadian Journal of Botany. Ottawa, 41:1377-1382.
- FEIST, W.C.; G.J. HAJNY & E.L. SPRINGER, 1973a. Effect of
storing green wood chips at elevated temperatures. Tappi.
Atlanta, 56:91-95.
- FEIST, W.C.; E.L. SPRINGER & G.J. HAJNY, 1973b. Spontaneous
heating in piled wood chips - Contribution of bacteria.
Tappi. Atlanta, 56:148-151.

- FERGUS, C.L., 1969. The cellulolytic activity of thermophilic fungi and actinomycetes. *Mycologia*. New York, 61:120-129.
- FERNANDES, P.S., 1977. Qualidade da madeira e os fatores do meio. *Publicação IF*. São Paulo, 12:1-12.
- FERRARI, M.P. & T.L. KRUGNER. 1984. Microrganismos na tecnologia de produção de celulose. *Informações SQCE*. Piracicaba, 8, 2 p.
- FLANNIGAN, B., 1970. Degradation of arabinoxylan and carboxymetil cellulose by fungi isolated from barley kernels. *Transactions of the British Mycological Society*. London, 55:277-288.
- FLANNIGAN, B. & P.N. SELLARS, 1972. Activities of thermophilous fungi from barley kernels against arabinoxylan and carboxymetil cellulose. *Transactions of the British Mycological Society*. London, 58:338-341.
- FOELKEL, C.E.B. & C. ZVINAKEVÍCIUS, 1979. Estudo da influência da deterioração de cavacos de eucalipto nas propriedades da celulose kraft. *O papel*. São Paulo, 40:40-48.

- FULLER, W.S., 1985. Chip pile storage - a review of practices to avoid deterioration and economic losses. Tappi Journal. Atlanta, 68:48-52.
- GATTANI, M.L., 1954. The agar plate spore germination method for testing fungicides. Phytopathology. Saint Paul, 44:113-115.
- GOCHENAUR, S.E., 1975. Distributional patterns of mesophilous and thermophilous microfungi in two bahamian soil. Mycopathologia, Chicago, 62:131-141.
- HAIJNY, G.J., 1966. Outside storage of pulpwood chips. A review and bibliography. Tappi. Atlanta, 49:97a-105a.
- HATTON, J.V., 1970. Precise studies on the effect of outside chip storage on fiber yield: white spruce and lodgepole pine. Tappi. Atlanta, 53:627-638.
- HATTON, J.V. & K. HUNT, 1972. Effect of prolonged outside chip storage on yield and quality of kraft pulps from *Picea glauca* and *Pinus contorta* chips. Tappi. Atlanta, 55:122-126.

- HUDSON, H.J., 1973. Thermophilous and thermotolerant fungi in the air-spora at Cambridge. Transactions of the British Mycological Society. London, 60:596-598.
- HULME, M.A. & J.V. HATTON, 1976a. Influence of high temperatures during chip pile storage on hardwood fiber yields. Tappi. Atlanta, 59:154-155.
- HULME, M.A. & J.V. HATTON, 1976b. Increased kraft pulp fiber yields by chip treatment before outside storage: a laboratory assessment. Tappi. Atlanta, 59:108-111.
- JAIN, M.K.; K.K. KAPOOR & M.M. MISHRA, 1979. Cellulose activity, degradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. Transactions of the British Mycological Society. London, 73:85-89.
- JODICE, R.; R. FERRARA; J. CERUTI SCURTI; N. FIUSSELLO; F. OBERT & G. CANTINI CORTELEZZI, 1974. Miceti termofili. I. Contributo sull'isolamento, sul metabolismo e sulla capacità di degradazione di materiali organici. Allionia. Turin, 20:53-73.
- KANE, B.E. & J.T. MULLINS, 1973. Thermophilic fungi in a municipal waste compost system. Mycologia. New York, 65:1087-1100.

- KIRK, T.K. & M. SHIMADA, 1985. Lignin biodegradation: The microorganism involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. In: T. Higuchi (ed). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego, Academic Press. p. 579-605.
- KUBLER, H., 1982a. Air convection in self-heating piles of wood chips. Tappi. Atlanta, 65:79-83.
- KUBLER, H., 1982b. Self-heating of wood products due to residence oxygen. Wood Science. Madison, 15:97-100.
- LIMA, A.F.; J.C. GERYTCH; M.C.S. JORDÃO; M.L.O. D'ALMEIDA & R. CORAIOLA, 1980. Efeito da estocagem de cavacos de *Pinus elliottii* sobre a polpação kraft e aproveitamento de subprodutos. XIII Congresso Anual da ABCP - Trabalhos técnicos, São Paulo, 24 a 28 novembro de 1980. p. 249-256.
- LINDGREN, R.M. & W.E. ESLYN, 1961. Biological deterioration of pulpwood and pulp chips during storage. Tappi, Atlanta, 44:419-429.
- NORMAN, A.G.; L.A. RICHARDS & R.E. CARLYLE, 1941. Microbial thermogenesis in the decomposition of plant materials. II. Factors involved. Journal of Bacteriology. Baltimore, 41:699-724.

- OBERT, F., 1979. Sul metabolismo di mono-, oligo- e polissacaridi in *Thermoascus aurantiacus* Mieh. *Allionia*. Turin, 23:79-82.
- OPOSU-ASIEDU, A. & R.S. SMITH, 1973a. Some factors affecting wood degradation by thermophilic and thermotolerant fungi. *Mycologia*. New York, 65:87-98.
- OPOSU-ASIEDU, A. & R.S. SMITH, 1973b. Degradation of three softwoods by thermophilic and thermotolerant fungi. *Mycologia*. New York, 65:240-244.
- ONIONS, A.H.S.; D. ALLSOPP & H.O.W. EGGINS, 1981. *Smith's introduction to industrial mycology*. London, Edward Arnold Ltd. 398 p.
- OSO, B.A., 1978. The production of cellulase by *Talaromyces emersonii*. *Mycologia*. New York, 70:577-585.
- ROSENBERG, S.L., 1975. Temperature and pH optima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, 21:1535-40.
- ROSENBERG, S.L., 1978. Cellulose and lignocellulose degradation by thermophilic and thermotolerant fungi. *Mycologia*, New York, 70:1-13.

- ROTHROCK JR, C.W.; R.S. SMITH & R.M. LINDGREN , 1961. The effects of outside storage on slash pine chips in the south. Tappi. Atlanta, 44:65-72.
- SAMSON, R.A., 1981. Thermophilic fungi. A revision. In: Fungi in Extreme Environments. Cambridge, Cambridge University Press. Bulletin of the British Mycological Society. Vol. 15, Supplement 2. 28 p.
- SANDHU, D.K. & S. SINGH. 1985. Airborne thermophilous fungi at Amritsar, India. Transactions of the British Mycological Society. London, 84:41-45.
- SCHIPPER, M.A.A., 1978. On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. Studies in Mycology. Baarn, 17:53-71.
- SCHMIDT, F.L., 1969. Observations on spontaneous heating toward combustion of commercial chip piles. Tappi. Atlanta, 52:1700-1701.
- SIMÕES, J.W.; A.S.R. COELHO; H.A. MELLO & H.T.Z. COUTO, 1980. Crescimento e produção de madeira de eucalipto. IPEF. Piracicaba, 20:77-97.

- SMITH, R.S., 1975. Deterioration of pulpwood by fungi and its control. Transactions of the Technical Section. Vancouver; 1:33-37.
- SMITH, R.S. & A. OFOSU-ASIEDU, 1972. Distribution of thermophilic and thermotolerant fungi in a spruce-pine chip pile. Canadian Journal of Forest Research. Ottawa, 2:16-26.
- SMITH, S.M., 1981. The physiological basis of response to extreme environmental conditions. In: Fungi in Extreme Environments. Cambridge, Cambridge University Press. Bulletin of the British Mycological Society. Vol. 15, Supplement 2. 28 p.
- SOMSEN, R.A., 1962. Outside storage of southern pine chips. Tappi. Atlanta, 45:623-628.
- STOLK, A.C. & R.A. SAMSON, 1972. The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera II. Studies in Mycology. Baarn, 2. 65 p.
- SUSSMAN, A.S., 1974. Microrganismos: crescimento, nutrição e interação. J.L. Azevedo e N.G.R. Lotti. trad. São Paulo, EDART, 159 p.

- TANSEY, M.R., 1971. Isolation of thermophilic fungi from self-heated, industrial wood chip piles. *Mycologia*. New York. 63:537-547.
- TANSEY, M.R. & M.A. JACK, 1976. Thermophilic fungi in sun-heated soils. *Mycologia*. New York. 68:1061-1075.
- TANSEY, M.R. & T.D. BROCK, 1978. Microbial life at high temperatures: ecological aspects. In: KUSHNER, D.J. ed. *Microbial Life in Extreme Environments*. London, Academic Press. p. 159-216.
- TANSEY, M.R.; C.B. FLIERMANS & C.D. KERN, 1979. Aerosol dissemination of veterinary pathogenic and human opportunistic thermophilic and thermotolerant fungi from thermal effluents of nuclear production reactors. *Mycopathologia*. Chicago, 69:91-115.
- THORNQUIST, T. & H. LUNDSTRÖM 1980. Factors affecting the occurrence of fungi in fuel chips for domestic consumption. The Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Forest Products. Uppsala, R117, 36 p.

- UPSHER, F.J., 1985. Spore deposition on the exposed agar plate. Transactions of the British Mycological Society. London, 84:162-4.
- WARD, J.E. & G.J. COWLEY, 1972. Thermophilic fungi of some central south Carolina forest soils. Mycologia. New York. 64:200-5.
- WEDBERG, S.E. & L.F. RETTGER, 1941. Factors influencing microbial thermogenesis. I. Journal of Bacteriology, Baltimore, 41:725-43.
- ZOCH, L.L.; E.L. SPRINGER & G.J. HAJNY, 1976. Storage of aspen whole-tree chips under laboratory conditions. USDA Forest Service. FPL Research Paper. Madison, 288, 6 p.

lha. A avaliação da incidência de microrganismos termófilos foi efetuada com 24, 48 e 72 horas de incubação em meio BDA a 50°C. Os lotes subsequentes compunham-se de cavacos, armazenados ao ar livre, retirados dos coletores aos 34, 64 e 95 dias de estocagem na pilha e uma coleta final manual ao 149 dias de armazenamento. Foram homogeneizados e separados 100 cavacos ao acaso, por ponto de coleta. A avaliação da incidência dos fungos termófilos foi feita com 24 horas de incubação em meio BDA a 50°C.

Os fungos isolados foram transferidos para tubos de ensaio com meio BDA e armazenados dentro de câmara fria para futuros estudos taxonômicos e fisiológicos.

3.2.4. Isolamento de fungos termófilos em vários pontos da fábrica.

A principal finalidade desta série de atividades foi a detecção das possíveis fontes de inóculo de fungos termófilos.

Solos sob talhões florestais foram coletados, através da raspagem da camada de 2 a 3 cm da superfície, em vários pontos do talhão, totalizando 100 g. O solo amostrado foi acondicionado em sacos de polietileno, selados, transportados e mantidos sob refrigeração (5°C) até o momento do plaqueamen-

to. Segundo metodologia de GOCHENAU (1975), foi efetuado o plaqueamento de solo em ágar fundente colocando-se 1,0 g de solo em placa de Petri estéril, juntamente, com 1,0 ml de água destilada estéril para se efetuar a mistura entre os dois. Sobre esta mistura foram vertidos 25 ml de meio de Martin fundente (40 - 45°C), cuja composição foi descrita no Ensaio 1. Foram amostrados 4 talhões comerciais, formados por *Eucalyptus*, em Mogi Guaçu, SP., e 5 talhões em São Simão, SP.. Para cada talhão foram feitos 3 plaqueamentos de solo, correspondendo a 3 placas.

Foi efetuada a coleta dos esporos presentes no ar, em pontos próximos à pilha de cavacos da fábrica, pela exposição de placas de Petri com meio de Martin por 10 minutos (SANDHU & SINGH, 1985).

A água para lavagem das toras e da lagoa de tratamento de efluentes industriais, devido à sua proximidade da pilha, foram analisadas para determinação da presença de fungos termófilos. A partir de 1000 ml de água coletada na fábrica, retirou-se a alíquota de 1,0 ml que, transferida para placas de Petri com meio de Martin, foi espalhada com uma alça de Drigalski flambada com álcool.

Todas as placas inoculadas foram incubadas, por 72 horas em estufas controladas a 50°C, sendo efetuada ao final da incubação, a avaliação qualitativa dos fungos termófilos nos referidos substratos.

3.2.5. ENSAIO 3 - Determinação de taxas de crescimento micelial dos fungos termófilos em diferentes temperaturas.

Dos isolados preservados em tubos de BDA foram separados 3 isolados de cada gênero, para se cobrir a variação natural entre os mesmos.

O meio de cultura utilizado para o ensaio foi o BDA. A inoculação constou da transferência de um disco de micélio vegetativo, com 6 mm de diâmetro, retirado de placas de BDA com culturas puras dos fungos, para o centro das placas. Os discos foram retirados dos bordos de colônias incubadas a 40°C.

As placas, após a inoculação, foram incubadas em estufas controladas a 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C, com as duas últimas temperaturas exigindo o emprego de cubas de vidro com chumaço de algodão úmido no seu interior, sendo todo o conjunto colocado dentro da estufa. Este procedimento visou evitar a dessecação rápida do meio pela ação da alta temperatura (BROCK & ROSE, 1969).

Fez-se a avaliação do crescimento micelial, através da medição da taxa de crescimento linear da colônia do fungo, quando a colônia se apresentava com os bordos distanciando-se de 1,0 a 1,5 cm dos bordos da placa. Efetuou-se a me-

dição de dois diâmetros perpendiculares entre si para obtenção do diâmetro médio. Para se conseguir a taxa de crescimento dividiu-se o diâmetro médio da colônia pelo tempo de incubação, com os valores sendo expressos em mm/h.

Cada isolado possuía 3 repetições, correspondendo cada repetição a uma placa de Petri.

3.2.6. ENSAIO 4 - A valiação da germinação dos esporos de fungos termófilos em diferentes temperaturas.

Para análise do efeito da temperatura requerida, pelos fungos termófilos, para germinação dos propágulos, utilizou-se como parâmetro de estudo, o período latente de germinação, tempo mínimo requerido para início da germinação ou da menor percentagem de germinação, em uma dada temperatura (COCHRANE, 1958).

O método foi adaptado do teste de germinação de esporos de GATTANI (1954). Em placas de Petri com culturas esporulantes puras, foram colocados 9 ml de água destilada estéril e gentilmente raspadas com uma alça de Drigalski flambada em álcool, obtendo-se uma suspensão de esporos cuja concentração foi determinada com o auxílio de hemacitômetro (câmara de Neubauer). Com a ajuda de uma pipeta estéril, foi transfe-

rida uma alíquota da suspensão, contendo aproximadamente 10^8 esporos, para cada placa de Petri com ágar-água (ágar-ágar, 18 g e água destilada q.s.p. 1000 ml), sendo espalhada pela superfície do meio sólido com alça de Drigalski flambada.

De cada fungo foram estudados os 3 isolados, com cada isolado tendo 4 placas, repetições para as diferentes temperaturas, que foram colocados para incubação em estufas controladas a 20, 30, 40 e 50°C. A avaliação da germinação, observação em microscópio ótico em ocular de menor aumento (100 x), foi efetuada em períodos de 2 em 2 horas.

3.2.7. ENSAIO 5 - Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono no desenvolvimento de três fungos termófilos.

Partindo-se de um meio base, no qual foram adicionadas várias fontes de carbono, avaliou-se os seus efeitos no crescimento micelial dos gêneros isolados: *Aspergillus*, *Rhizomucor* e *Thermoascus*. Para produção de inóculo, foram retirados da câmara fria, repicados para placas com meio BDA e incubados a 40°C.

A composição do meio foi baseada em meio mínimo para *Neurospora*, apresentado por SUSSMAN (1974). Para a preparação do meio mínimo foram empregadas 3 soluções estoques

(Tabela 3). A elaboração dos meios foi desenvolvida pela padronização e adição de 20,0 g de carboidratos por litro de meio de cultura, sendo utilizados dextrose, sacarose, amido, carboximetil celulose e hidrolisado de madeira, com 18,0g de ágar-ágar e 20,0 ml da solução estoque de meio mínimo.

As placas de Petri com os meios de cultura foram inoculadas com discos de micélio vegetativo com 9 mm de diâmetro e incubadas em estufa controlada a 40°C. O desenvolvimento dos microrganismos foi avaliado pela taxa de crescimento micelial da colônia, em mm/h, como já descrito no Ensaio 3, após um período de 24 horas de incubação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 x 6, com 4 repetições, correspondendo cada repetição uma placa de Petri.

Tabela 3 - Soluções estoque para elaboração do meio mínimo
Composição.

Solução 1

Biotina	1 mg
Água destilada	10 ml

Solução 2

Ácido cítrico H_2O	5,0 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0 g
$Fe(NH_4)_3(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	1,0 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,25g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05g
H_3BO_3 anidro	0,05g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,05g
Água destilada	95 ml

Meio Mínimo - Estoque

Na_3 citrato . $5 \frac{1}{2} H_2O$	150 g
Na_3 citrato . $2 H_2O$	125 g
KH_2PO_4 anidro	250 g
NH_4PO_4 anidro	100 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5,0 g
Solução 1	25 ml
Solução 2	5 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

3.2.8. ENSAIO 6 - Teste do hidrolisado de madeira-água como meio de cultura para fungos termófilos isolados de cavacos de eucalipto.

O procedimento para obtenção do hidrolisado de madeira e elaboração do IMA são os mesmos do Ensaio 2. Foram utilizados os gêneros *Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Sporotrichum*, *Penicillium* e *Thermoascus* para estudo do meio IMA como meio para cultivo de fungos termófilos. O inóculo constou de discos de micélio vegetativo com 9 mm de diâmetro, retirados de culturas puras em BDA e transferidos para o centro de placas, que foram incubadas em estufas controladas a 40°C.

A avaliação do crescimento micelial foi feita como no Ensaio 5, obtendo-se a taxa de crescimento micelial em mm/h, após um período de 24 horas de incubação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cada gênero tendo 4 repetições, correspondendo cada repetição a uma placa de Petri.

3.3. Identificação dos fungos termófilos isolados.

A identificação dos fungos isolados de cavacos de madeira foi desenvolvida e completada pela condução de trabalhos, em conjunto com o Instituto de Botânica - SP. Processou-se a identificação tendo por base a literatura até o

presente momento, enquanto haviam sido efetuados contatos com outros especialistas em taxonomia, no exterior, para maiores indicações ou informações para a confirmação da identidade dos isolados.

IV - RESULTADOS

4.1. Monitoramento das condições da pilha

A temperatura dos pontos a 15 m de profundidade mantiveram-se mais altas, do que as temperaturas dos pontos a 3 m. estes últimos com valores iniciais próximos da temperatura ambiente (Tabela 4). Com o decorrer do tempo, as temperaturas destes pontos mais externos tornaram-se inferiores às observadas no ambiente. Notou-se uma grande variação nos valores internos, acompanhando a variação do ambiente e a precipitação mensal (Tabela 5). A relação entre as temperaturas e a precipitação mensal, demonstra um distinto decréscimo nas temperaturas médias mensais da pilha de modo mais pronunciado nos pontos externos da pilha, sendo que no mês de outubro com a diminuição da precipitação, houve elevação da temperatura (Figura 3).

Tabela 4 - Evolução da temperatura ambiente e nos pontos internos da pilha de cavacos de *Eucalyptus* armazenados ao ar livre.

DATA	Temperatura (°C)				
	Ambiente	Pontos internos*			
		1	2	3	4
13/06	37	36	43	-	-
14/06	31	36	43	34	29
15/06	37	36	45	40	37
18/06	41	36	49	47	48
19/06	34	34 (37)	48 (39)	47 (49)	48 (43)
20/06	41	36	52	50	43
22/06	36	35	50	49	53
25/06	40	36	33	53	56
27/06	40	39	26	55	54
28/06	25	38	22	54	50
29/06	35	41	23	58	49
02/07	34	47	21	58	33
04/07	33	54	22	49	26
10/07	38	57	31	51	24
11/07	36	58 (57)	32 (21)	47 (45)	24 (27)
12/07	40	60	34 (21)	42 (45)	25 (27)
13/07	37	60	33	38	24
19/07	32	60	23	35	28
30/07	38	56	22	41	31
10/08	35	52	24	44	27
15/08	28	50	29	45	27
22/08	20	48 (47)	16 (29)	45 (48)	23 (25)
28/08	26	47	26	47	23
31/08	29	48	25	48	25
06/09	34	48	23	50	25
10/09	32	48	23	52	25
12/09	39	49 (49)	25 (21)	56 (59)	26 (26)
17/09	34	49	23	56	26
28/09	28	52	33	58	29
10/10	40	55	34	60	35
15/10	38	56	30	60	37
17/10	43	55 (53)	29 (31)	60 (61)	38 (39)
22/10	44	59	33	62	36
29/10	42	60	30	63	34

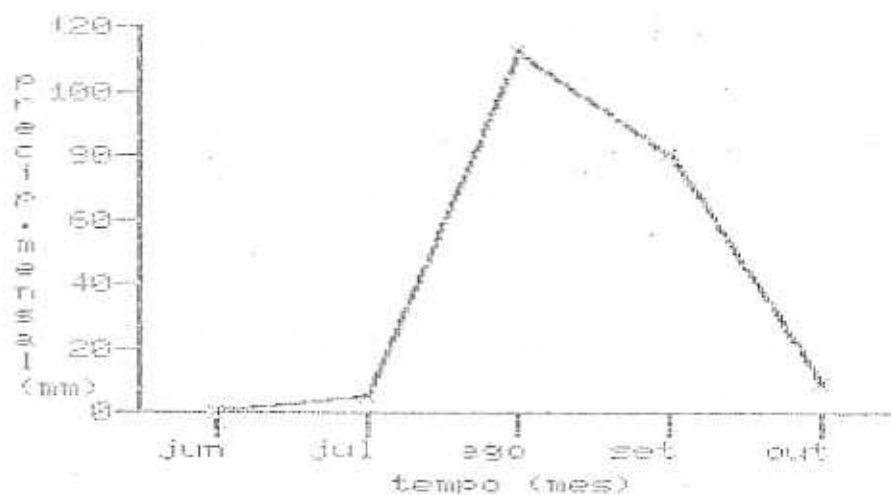
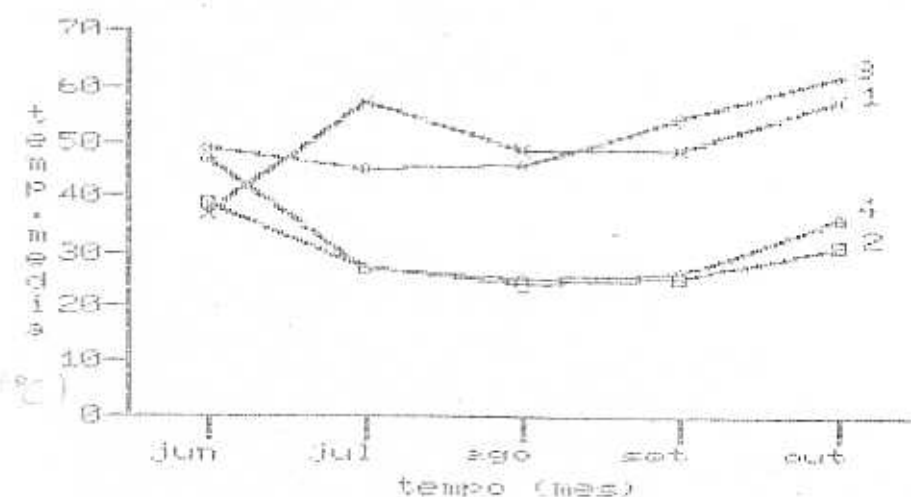
* Pontos internos: 1 - 15 m profundidade e 1 m de altura do solo
 3 - 15 m profundidade e 3 m de altura do solo
 2 - 3 m profundidade e 1 m de altura do solo
 4 - 3 m profundidade e 3 m de altura do solo

Tabela 5 - Precipitação mensal (mm) observada na fábrica da Champion Papel e Celulose S/A em Mogi Guaçu, SP., durante o período de armazenamento.

MÊS	Precipitação mensal (mm)
Junho	0
Julho	5
Agosto	113
Setembro	81
Outubro	9
Novembro	127

A umidade dos cavacos indicou a manutenção da umidade em teores próximos, nos pontos amostrados, durante o armazenamento ao ar livre (Tabela 6). Notou-se uma leve tendência para perda de umidade com o decorrer do tempo de armazenamento, havendo pequenas elevações do teor de umidade no ponto mais externo da pilha, após 64 e 149 dias, devido a ocorrência de precipitações nos meses de agosto e novembro, respectivamente aos 60 e 150 dias de estocagem.

Com relação ao pH da solução obtida dos cavacos, foi observada a tendência do decréscimo nos valores do pH com o aumento do período de armazenamento e que os menores valores foram encontrados no ponto mais interno da pilha (Tabela 7).



SENSORES DE TEMPERATURA

- 1 - 15 m. de profundidade e 1,5 m. de altura do solo
- 3 - 15 m. de profundidade e 3 m. de altura do solo
- 2 - 3 m. de profundidade e 1,5 m. de altura do solo
- 4 - 3 m. de profundidade e 3 m. de altura do solo

FIGURA 3 - Relação entre as temperaturas médias mensais ($^{\circ}\text{C}$), nos pontos de amostragem e a precipitação mensal (mm) na pilha de cavacos de eucalipto.

Tabela 6 - Teores médios* da umidade dos cavacos (%) coletados em dois pontos internos da pilha de cavacos de eucalipto, durante o armazenamento ao ar livre, em Mogi Guaçu, SP.

Ponto da coleta**	Período de armazenamento (dias)***			
	34	64	95	149
1	41,6	38,0	38,9	34,9
2	37,8	37,5	39,0	41,9

* O valor percentual apresentado é média de 3 repetições.

** Pontos de Coleta: 1-6,5 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.
2-6,5 m profundidade e 3,0 m de altura do solo.

*** A amostragem dos cavacos recém-picados, na montagem da pilha, apresentou o teor da umidade de 41,0%.

Tabela 7 - Valores médios* de pH obtidos dos cavacos coletados em dois pontos internos da pilha de cavacos de eucalipto, durante o armazenamento ao ar livre, em Mogi Guaçu, SP.

Ponto da coleta**	Período de armazenamento (dias)***			
	34	64	95	149
1	3,63	3,72	3,66	-
2	4,00	3,90	3,84	-

* O Valor absoluto apresentado é média de 3 repetições.

** Pontos de coleta: 1 - 6,5 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.
2 - 6,5 m profundidade e 3,0 m de altura do solo.

*** A amostragem dos cavacos recém-picados, na montagem da pilha, apresentou o valor médio do pH de 4,05.

4.2. Atividades conduzidas no laboratório

4.2.1. Efeito de diferentes meios de cultura no isolamento de microrganismos termófilos.

A avaliação do Ensaio 1 revelou diferentes frequências para os microrganismos termófilos, fungos e bactérias, surgidos a partir dos cavacos de madeira nos três meios de cultura estudados (Tabela 8). Comparando-se os substratos, observou-se que o meio Nutriente-ágar apresentou a maior quantidade média de isolados, bem como um maior número de bactérias termófilas sem alterar a frequência de fungos isolados em BDA. O meio de Martin apresentou decréscimo na frequência dos microrganismos, em relação aos anteriores, pela presença de sulfato de estreptomicina e rosa bengala em sua composição.

No Ensaio 2, a comparação do meio BDA contra o meio HMA, foi avaliada pelas frequências de microrganismos termófilos (Tabela 9) e as frequências dos gêneros de fungos termófilos (Tabela 10), isolados de cavacos recém-picados e armazenados por 4 meses. Foi registrado um número quantitativo e qualitativamente menor de microrganismos termófilos em BDA, em qualquer dos lotes de cavacos amostrados.

Tabela 8 - Frequência de microrganismos termófilos (%) isolados, a partir de cavacos de eucaliptos armazenados ao ar livre, em três meios de cultura incubados a 50°C por 48 horas.

Categoria de Microrganismo	Meio de Cultura		
	BDA	NA	MARTIN
Fungo	37*	37	20
Bactéria	41	63	11
MÉDIA	39	50	16

* O valor representa a porcentagem de fragmentos plaqueados nos quais houve crescimento de microrganismos.

Tabela 9 - Frequência de colônias bacterianas e de gêneros de fungos termófilos (%), isolados de dois lotes de cavacos de eucalipto, incubados em BDA e HMA a 50°C por 48 horas.

Meio de Cultura	Microrganismos	CAVACOS	
		Recém-Picados	Armazenados*
LMA	Fungo	0**	2
	Bactéria	0	0
BDA	Fungo	2	5
	Bactéria	0	2

* Os cavacos foram coletados de uma pilha com 4 meses de estocagem.

** O valor representa a porcentagem de fragmentos plaqueados nos quais houve crescimento de microrganismos.

Tabela 10 - Discriminação dos gêneros de fungos termófilos e respectiva frequência (%) isolados a partir de dois lotes de cavacos de eucalipto, incubados em BDA e HMA por 48 horas.

Meio de Cultura	Lote de Cavacos	Fungos	Frequência (%)*
HMA	Recém-picados	nenhum fungo isolado	
	Armazenados	<i>Aspergillus</i> sp.	1
		<i>Penicillium bacillisporum</i>	1
BDA	Recém-picados	<i>Aspergillus</i> sp.	
		<i>Penicillium bacillisporum</i>	
	Armazenados	<i>Aspergillus</i> sp.	84
		<i>Rhizomucor</i> sp.	19
		<i>Sporotrichum</i> sp.	2
		<i>Penicillium bacillisporum</i>	54
		<i>Thermoascus aurantiacus</i>	2

* O valor representa a porcentagem de fragmentos plaqueados, nos quais houve crescimento de microrganismos.

4.2.2. Frequência de fungos termófilos em pilhas de cavacos de eucalipto e em vários locais próximos da fábrica de papel.

O levantamento da incidência de microrganismos termófilos na pilha de cavacos da fábrica, tomou por base de amostragem cavacos recém-picados e cavacos com vários períodos de armazenamento. A avaliação das placas de meio de cultura inoculadas com os cavacos, foi efetuada após 72 horas de incubação a 50°C, visando impedir auto-contaminações de fungos com alta taxa de esporulação e rápido crescimento micelial, bem como o problema de ressecamento do meio. Dos quatro pontos amostrados, apenas três apresentaram fungos, bactérias e leveduras em baixa e constante incidência (Tabela 11). Os gêneros de fungos identificados foram: *Sporotrichum* (2%) no ponto 2 e (1%) no ponto 3, e *Penicillium bacillisporum* (4%) no ponto 4.

A análise dos cavacos estocados mostrou uma grande variação na frequência de microrganismos nas diversas épocas de amostragem. O número de bactérias e leveduras termófilas isoladas foi maior, em média, quando os cavacos foram flambados com álcool, independentemente do ponto de coleta (Tabela 12). Foram registradas aos 64 e 95 dias, as maiores porcentagens de isolamento e posterior queda nos valores no isolamento efetuado aos 149 dias, este último período apresentando porcentagens similares às encontradas com 34 dias de estocagem. Para os

fungos isolados observou-se claramente, o efeito da esterilização externa no isolamento e a falta de um padrão de distribuição durante o período de armazenamento (Tabela 13). Os fungos *Aspergillus* e *Sporotrichum* foram os mais frequentes nos dois métodos de isolamento e como *Rhizomucor* apresentaram diminuição no número de isolados quando da esterilização externa. Com *Dactylomyces thermophilus* foram observados valores médios de frequências similares, com ou sem esterilização, e como *P. bacillisporum*, mostrou menor número de isolados a partir do ponto mais interno, onde haviam sido registrados as maiores temperaturas (Tabela 4). *Thermoascus aurantiacus* foi isolado em maior quantidade em cavacos flambados, com baixa incidência em cavacos não esterilizados, demonstrando um provável efeito negativo ao crescimento ou maior especificidade para desenvolvimento no interior do cavaco.

Foi estudada em conjunto, a presença de fungos termófilos em solos de formações florestais de *Eucalyptus*, e dentro da fábrica, nas águas residuais para lavagem de toras e da lagoa de tratamento de efluentes e no ar adjacente à pilha de cavacos (Tabela 15). *Aspergillus* e *P. bacillisporum* foram os fungos de maior ocorrência, sendo registrados no solo, nas águas residuais e no ar. Todos os fungos estiveram presentes no solo coletado, com exceção de *D. thermophilus* que não foi isolado na fábrica, mas ocorreu em isolamentos efetuados com cavacos da pilha.

Tabela 11 - Incidência (%) de microrganismos termófilos isolados de cavacos de eucalipto recém-picados e flambados em álcool, retirados de 4 pontos na pilha e incubados em meio BDA, a 50°C por 72 horas.

Microrganismos	Ponto de coleta *			
	1	2	3	4
Bactérias e leveduras	3	2	6	5
Fungos	0	2	4	1
Cavacos sem microrganismos	97	96	90	94

* Ponto de coleta: 1 - 15 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.
 2 - 15 m profundidade e 3 m de altura do solo.
 3 - 3 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.
 4 - 3 m profundidade e 3 m de altura do solo.

Tabela 12 - Incidência (%) de bactérias e leveduras termófilas em cavacos de *Eucalyptus* em vários períodos de armazenamento, a partir de dois pontos internos da pilha, sob dois métodos de isolamento e incubação em BDA por 24 horas a 50°C.

Ponto de coleta *	Métodos de Isolamento**	Período de armazenamento (dia)				Média
		34	64	95	149	
1	E	6	90	26	12	33,5
	N	3	24	81	2	27,5
2	E	11	99	34	13	39,3
	N	0	24	70	5	24,8

* Ponto de coleta: 1 - 6,5 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.
 2 - 6,5 m profundidade e 3 m de altura do solo.

** Método de isolamento: E - cavaco flambado externamente em álcool.
 N - cavaco não flambado.

Tabela 13 - Frequência (%) dos fungos termófilos em dois pontos internos da pilha de cavacos de *Eucalyptus*, com vários períodos de armazenamento, isolados de cavacos flambados e incubação em BDA por 72 horas e 50°C.

FUNGOS	Ponto de coleta *	Período de armazenamento (dias)				Média
		34	64	95	149	
<i>Aspergillus</i> sp.	1	48	35	31	30	36,0
	2	19	6	2	2	7,3
<i>D. thermophilus</i>	1	0	0	4	5	2,3
	2	6	0	41	0	11,8
<i>Rhizomucor</i> sp.	1	1	1	0	0	0,5
	2	2	0	0	0	0,5
<i>Sporotrichum</i> sp.	1	34	12	41	24	27,8
	2	45	14	37	1	24,3
<i>P. bacillisporum</i>	1	3	0	23	25	12,8
	2	53	1	27	30	27,8
<i>T. aurantiacus</i>	1	44	0	9	52	25,5
	2	2	0	20	35	14,3

* Ponto de coleta: 1 - 6,5 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.

2 - 6,5 m profundidade e 3 m de altura do solo.

Tabela 14 - Frequência (%) dos fungos termófilos em dois pontos internos da pilha de cavacos de *Eucalyptus*, com vários períodos de armazenamentos, isolados de cavacos não flambados e incubação em BDA por 72 horas a 50°C.

FUNGOS	Ponto de coleta *	Período de armazenamento (dias)				Média
		34	64	95	149	
<i>Aspergillus</i> sp.	1	78	96	100	100	93,5
	2	96	100	84	0	70,0
<i>D. thermophilus</i>	1	5	0	1	0	1,5
	2	7	0	47	0	15,5
<i>Rhizomucor</i> sp.	1	39	22	1	6	17,0
	2	54	5	2	0	15,3
<i>Sporotrichum</i> sp.	1	11	34	82	21	37,0
	2	49	81	94	0	56,0
<i>P. bacillisporum</i>	1	45	1	1	4	12,8
	2	99	2	7	97	51,5
<i>T. aurantiacus</i> sp.	1	6	0	0	0	1,5
	2	0	0	3	4	1,8

* Ponto de coleta: 1 - 6,5 m profundidade e 1,5 m de altura do solo.

2 - 6,5 m profundidade e 3 m de altura do solo.

Tabela 15 - Ocorrência de fungos termófilos, em solos de talhões florestais e em três pontos da fábrica, isolados em meio de Martin e incubado por 72 horas a 50°C.

Fungos Isolados	Talhões Florestais *		Água p/lava gem das to- ras **	Lagoa de trata- mento de eflu- entes **	Coleta de Esporos do ar **
	Mogi Guaçu	São Simão			
<i>Aspergillus</i> sp	2	4	+	+	+
<i>D.thermophilus</i>	-	-	-	-	-
<i>Rhizomucor</i> sp	2	1	-	+	+
<i>Sporotrichum</i> sp	-	1	-	+	-
<i>P.bacilliporum</i>	2	3	+	+	+
<i>T.aurantiacus</i>	2	3	-	-	+

* Foram amostrados talhões de *Eucalyptus* em Mogi Guaçu - SP (4) e em São Simão - SP (5), sendo indicado o número de talhões, onde o fungo foi isolado.

** Indicação do fungo:

+ : presente

- : ausente

4.2.3. Avaliação das taxas de crescimento micelial dos fungos isolados, sob diferentes temperaturas.

Com base nos valores obtidos, pode-se verificar a existência de diferenças entre as taxas de crescimento ótimo com os fungos estudados (tabelas 16 a 21). Para *Aspergillus* e *P. bacillisporum* seu ponto ótimo de crescimento foi 30°C, enquanto que *Rhizomucor* demonstrou melhor crescimento a 40°C. *D. thermophilus*, *Sporotrichum* e *T. aurantiacus* apresentaram maiores taxas de crescimento a 50°C. Coincidentemente, os gêneros com crescimento a 20°C possuíam pontos ótimos de temperatura mais baixos que as temperaturas da pilha, com taxas de crescimento a 50°C bem inferiores aos outros fungos termófilos. Por outro lado, os fungos com ótimo de temperatura a 50°C não cresceram a 20°C. Não houve crescimento dos fungos nas temperaturas de 60 e 70°C dentro do período de incubação.

Tabela 16 - Taxas de crescimento micelial (mm/h) de isolados de *Aspergillus* sp, incubados em BDA sob diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), até 9 dias.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Média
20	0,28	0,29	0,27	0,28
30	0,72	0,77	0,77	0,75
40	0,79	0,63	0,42	0,61
50	0,19	0,20	0,19	0,19
60	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

* Cada valor é média de 3 repetições e cada repetição corresponde a uma placa de Petri.

Tabela 17 - Taxas de crescimento micelial (mm/h) de isolados de *D. thermophilus*, incubados em BDA sob diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), até 12 dias.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Média
20	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,44	0,50	0,36	0,43
40	1,21	1,18	0,58	0,99
50	1,24	1,31	1,22	1,26
60	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

* Cada valor é média de 3 repetições e cada repetição corresponde a uma placa de Petri.

Tabela 18 - Taxas de crescimento micelial (mm/h) de isolados de *P. bacillisporum*, incubados em BDA sob diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), até 9 dias.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Média
20	0,13*	0,12	0,12	0,18
30	0,33	0,30	0,28	0,30
40	0,29	0,25	0,30	0,28
50	0,10	0,11	0,09	0,10
60	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

* Cada valor é média de 3 repetições e cada repetição corresponde a uma placa de Petri.

Tabela 19 - Taxas de crescimento micelial (mm/h) de isolados de *Rhizomucor* sp, incubados em BDA sob diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), até 9 dias.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Média
20	0,84*	0,09	0,12	0,35
30	1,91	1,09	1,52	1,51
40	2,90	1,80	2,01	2,24
50	2,05	1,58	2,42	2,02
60	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

* Cada valor é média de 3 repetições e cada repetição corresponde a uma placa de Petri.

Tabela 20 - Taxas de crescimento micelial (mm/h) de isolados de *Sporotrichum* sp, incubados em BDA sob diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), até 12 dias.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Média
20	0,00*	0,00	0,00	0,00
30	0,52	0,45	0,39	0,45
40	0,50	0,53	0,55	0,53
50	0,69	0,74	0,61	0,63 ^{1/2}
60	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

* Cada valor é média de 3 repetições e cada repetição corresponde a uma placa de Petri.

Tabela 21 - Taxas de crescimento micelial (mm/h) de isolados de *T. aurantiacus*, incubados em BDA sob diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$), até 12 dias.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Média
20	0,00*	0,00	0,00	0,00
30	0,39	0,14	0,42	0,32
40	3,68	4,03	3,81	3,95 ^{1/2}
50	4,99	5,54	5,48	5,37 ^{1/4}
60	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

* Cada valor é média de 3 repetições e cada repetição corresponde a uma placa de Petri.

4.2.4. Avaliação do período latente de germinação dos esporos de fungos isolados, sob diferentes temperaturas.

Com base no tempo gasto pelos esporos para germinação, foi determinado o período latente de germinação dos fungos isolados em várias temperaturas (Tabela 22). Partindo-se das taxas ótimas de crescimento descritas no Ensaio 3, pode-se notar que os fungos *Aspergillus* e *P. bacillisporum* com crescimento micelial a 20°C foram os únicos fungos com esporos germinados nesta temperatura. No outro extremo, os fungos que cresceram a 50°C, *D. thermophilus*, *Rhizomucor* e *T. aurantiacus*, mostraram esporos germinados nesta temperatura.

A temperatura ótima de germinação, determinada pelo menor período latente de germinação, de *Aspergillus*, *D. thermophilus* e *Rhizomucor* foi a mesma da maior taxa de crescimento micelial. Com *P. bacillisporum*, a temperatura do menor período latente esteve acima da temperatura ótima de crescimento, enquanto que com *T. aurantiacus* houve o inverso. O fungo *Sporotrichum* apresentou problemas de germinação, pois houve crescimento a 30, 40 e 50°C e somente germinação a 30°C.

Tabela 22 - Período latente de germinação (h) dos fungos termófilos isolados a partir da pilha de cavacos, em ágar-água.*

Fungos	Temperaturas (°C)			
	20	30	40	50
<i>Aspergillus</i> sp	20-22	6- 8	8-10	58-60
<i>D. thermophilus</i>	SG**	20-22	12-14	24-26
<i>Rhizomucor</i> sp	68-70	12-14	2- 4	12-14
<i>Sporotrichum</i> sp	SG	12-14	SG	SG
<i>P. bacillisporum</i>	44-46	8-10	6- 8	SG
<i>T. aurantiacus</i>	SG	20-22	12-14	24-26

* Os valores apresentados são médias de três isolados de cada fungo.

** SG = Sem Germinação

4.2.5. Efeito de diferentes fontes de carbono no desenvolvimento de três fungos termófilos isolados.

O cultivo de *Aspergillus*, *Rhizomucor* e *T. aurantiacus* em meio mínimo adicionado de várias fontes de carbono foi avaliado pelas taxas de crescimento micelial (mm/h) dos fungos estudados, cujos valores estão expressos na Tabela 22. Não foram observados diferenças entre meio mínimo com dextrose, sacarose e amido, pequena entre estes e meio mínimo simples, porém significativas quando em comparação com hidrolisado de madeira e carboximetil celulose (CMC). Cada fungo apresentou uma fonte de carbono preferencial para seu melhor desenvolvimento, registrando-se para *Aspergillus*, *Rhizomucor* e *T. aurantiacus*, meio mínimo com amido (0,78 mm/h), dextrose (2,31 mm/h) e amido (1,28 mm/h), respectivamente. Sob outro ângulo, notou-se que o hidrolisado de madeira e CMC foram as piores fontes de carbono, haja visto terem produzido as menores taxas de crescimento micelial, com os fungos estudados.

Tabela 23 - Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento de *Aspergillus*, *Rhizomucor* e *T.aurantiacus*, em meio mínimo-ágar (MM) incubados por 24 horas a 40°C.

Meio de cultura	Taxas de crescimento (mm/h) ¹			
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Rhizomucor</i> sp.	<i>T.aurantiacus</i>	Média
MM-Testemunha	0,65	2,07	0,74	1,15 A
MM-Dextrose	0,74	2,31	0,69	1,25 AB
MM-Sacarose	0,74	2,25	1,07	1,35 A
MM-Amido	0,78	2,13	1,28	1,39 A
MM-Hidrolisado de madeira	0,71	1,60	0,41	0,91 D
MM-CMC	0,63	1,75	0,39	0,92 CD
MÉDIA	0,71 X	2,02 X	0,76 XY	

C.V. = 10,5%

- 1 - Médias de meios de cultura e médias de fungos seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 1%). Os valores foram obtidos da média de 4 repetições (Placas de Petri).

4.2.6. Avaliação do hidrolisado de madeira-agar como meio de cultura para fungos termófilos isolados de cavacos de eucalipto.

A elaboração de um meio sólido contendo hidrolisado de madeira com posterior inoculação de cinco gêneros de fungos termófilos forneceu, como parâmetro de análise deste meio, taxas de crescimento micelial relacionadas na Tabela 24. Os resultados obtidos mostraram o gênero *Rhizomucor* com taxa média, significativamente, maior que os outros gêneros, na temperatura de 40°C.

Comparando-se as taxas apresentadas com as observados no estudo da temperatura ótima de crescimento (Ensaio 3), exceção feita ao *P. bacillisporum*, todos os fungos demonstraram com o meio BDA, taxas de crescimento até três vezes maiores que as registradas com hidrolisado de madeira, provocando um certo efeito inibitório do hidrolisado de madeira com relação aos fungos isolados em BDA.

Tabela 24 - Taxas de crescimento (mm/h) de cinco gêneros de fungos termófilos cultivados em licor de madeira-água, incubados por 24 horas a 40°C.

FUNGOS	Taxas de crescimento (mm/h)				
	Repetições				Média
<i>Aspergillus</i> sp	0,62	0,52	0,56	0,54	0,56
<i>Rhizomucor</i> sp	1,31	1,27	1,27	1,23	1,27 A
<i>Sporotrichum</i> sp	0,25	0,27	0,27	0,25	0,26 D
<i>P.bacillisporum</i>	0,46	0,48	0,48	0,42	0,46 CD
<i>T.aurantiacus</i>	0,75	0,65	1,02	1,00	0,86 B

C.V. = 12.3%

- 1 - Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey 1%). Cada repetição corresponde a uma placa de Petri.