

Fungos anaeróbios

*Eduardo de Aquino Ximenes**

Resumo

A descoberta de fungos anaeróbios obrigatórios no rume de ovelha por Orpin, em 1975, impulsionou estudos sobre tais microrganismos em laboratórios de diferentes partes do mundo. Estes estudos têm mostrado que os fungos anaeróbios não contêm mitocôndrias; em vez disso, apresentam organelas conhecidas como hidrogenossomas, que estão envolvidas na geração de energia. Estes fungos ainda produzem enzimas que são encontradas sob a forma de um complexo multiprotéico de alta massa molecular, similar ao celulosoma produzido por bactérias anaeróbias, ou individualmente. Diferentes enzimas hidrolíticas, produzidas por variadas espécies destes fungos, principalmente celulolíticas e hemicelulolíticas, têm sido isoladas e caracterizadas. Estas enzimas, em geral, têm atividades específicas similares ou maiores do que outras produzidas por fontes aeróbias correspondentes, tendo, portanto, grande potencial para aplicação industrial.

Palavras-chave: Fungos anaeróbios. Hidrogenossomas. Hidrolases.

INTRODUÇÃO

Até alguns anos atrás, acreditava-se que as transformações metabólicas no rume eram mediadas pela ação de bactérias e protozoários. Os fungos não eram considerados habitantes deste ecossistema.

Espécies flageladas do rume apresentando uma forma esférico-ovóide foram inicialmente descritas por Liebetanz (1910) e Braune (1913). Tais espécies foram consideradas protozoários e receberam pouca atenção até o início dos estudos de Orpin (1975). Através desses estudos, os fungos anaeróbios foram reconhecidos e classificados como Critidiomicetos, com base na morfologia de seu talo e na presença de quitina

em sua parede celular (ORPIN, 1976, 1977). Acredita-se que a demora no reconhecimento deste grupo de fungos se vincula ao dogma microbiológico relacionado ao requerimento de oxigênio pelos fungos para crescerem, assim como à prática de microbiologistas, estudiosos do rume, de trabalhar com fluido peneirado proveniente deste e de descartar o material sólido digerido. Em relação a este último, o problema é que a maior parte da biomassa fúngica associada a fibras de planta era descartada junto com a fração sólida (BAUCHOP, 1983; TRINCI et al., 1994).

Atualmente, há cinco gêneros de fungos anaeróbios reconhecidos: *Neocalimastix*, *Pi-*

* Pesquisador da Universidade Católica do Salvador
Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA)
Centro de Pesquisa e Pós-Graduação (CEPEX)
Universidade Católica do Salvador
Av. Prof. Pinto Aguiar, nº 2.589 - Campus de Pituçu
40.710-000 - Salvador Bahia Brasil
Tel.: (71) 324-7872; Fax: (71) 324-7872
E-mail: eduardoax@ucsal.br

romyces, *Orpinomyces*, *Anaeromyces* e *Caecomyces*, os quais são delimitados pela morfologia do talo (monocêntrico, policêntrico e filamentosos/bulboso) e pelo número de flagelos por zoósporo (uniflagelados ou poliflagelados) (MUNN; ORPIN; GREENWOOD, 1988; BROOKMAN et al., 2000). Estas características, visíveis ao microscópio de luz, tendem a ser pleomórficas, variando com as condições de cultura, em particular com a fonte de carbono. Elas são também difíceis de ser usadas em situações em que estes fungos, principalmente os policêntricos, falham em produzir zoósporos abundantes. Uma classificação no nível de espécie é, no momento, bastante discutida (BROOKMAN et al., 2000). Espécies têm sido definidas em diferentes trabalhos de acordo com uma convenção taxonômica baseada na ultraestrutura do zoósporo (HEATH; BAUCHOP; SKIPP, 1983; WEBB; THEODOROU, 1991). Por outro lado, a validade deste método foi questionada, com base no fato de que as características ultraestruturais usadas para a classificação podem se alterar com a idade, o método e a qualidade da preparação (HO; BARR, 1995). Dados moleculares têm sido usados na tentativa de aclarar a classificação dos fungos anaeróbios. Em um trabalho recente (BROOKMAN et al., 2000), tais fungos foram identificados e caracterizados por meio de uma metodologia molecular, usando-se seqüências ITS1 ("internal transcribed spacer") ribossomais e rRNA 18S.

Conforme será descrito adiante, os fungos anaeróbios produzem uma grande variedade de enzimas e geralmente degradam um espectro maior de substratos quando comparados com as bactérias do rume (WUBAH; AKIN; BORNEMAN, 1993; TRINCI et al., 1994; SELINGER; FORSBERG; CHENG, 1996), sendo capazes de degradar os mais resistentes polímeros da parede celular de plantas (FORSBERG; CHENG, 1992; WUBAH; AKIN; BORNEMAN, 1993; SELINGER; FORSBERG; CHENG, 1996).

HIDROGENOSSOMAS

Uma variedade de eucariotos microbianos encontrados em diferentes ambientes anaeróbios não possui mitocôndrias (FENCHEL; FINLAY, 1995; VAN DER GIEZEN et al., 2002). Demonstrou-se que alguns desses microrganismos anaeróbios, dentre eles os fungos critídeos, possuem organelas produtoras de ATP, conhecidas como hidrogenossomas (FIGURA 1) (YARLETT et al., 1986), que são organelas altamente especializadas, envolvidas no metabolismo anaeróbio de carbono, gerando hidrogênio e ATP (AKHAMANOVA et al., 1999). As hidrogenases, enzimas sensíveis ao oxigênio, que podem produzir gás hidrogênio, são de grande importância para a função dos hidrogenossomas (DAVIDSON et al., 2002).

Os hidrogenossomas geram ATP por fosforilação no nível do substrato, não possuindo uma cadeia transportadora de elétrons e, com uma possível exceção, um genoma associado à organela (EMBLEY; HORNER; HIRT, 1997; AKHAMANOVA et al., 1998; DYALL et al., 2000). Estas organelas, em eucariotos contemporâneos, têm sua origem considerada independente, revelando uma capacidade extraordinária dos eucariotos de evoluírem repetidamente organelas produtoras de hidrogênio (VAN DER GIEZEN et al., 1997, 2002). Teorias iniciais para o hidrogenossoma, voltadas para uma origem endossimbiótica de uma bactéria (WHATLEY, J. M.; JOHN; WHATLEY, F. R., 1979), têm sido deixadas de lado pelo aparecimento de hipóteses apontando para uma origem endógena (VAN DER GIEZEN et al., 2002).

Trabalhos publicados por Van der Giezen e colaboradores (1997) e Benchimol, Durand e Almeida (1997) indicaram, quase simultaneamente, que hidrogenossomas no fungo *Neocallimastix frontalis* são envolvidos por uma membrana dupla. Um carreador ADP/ATP do tipo mitocondrial (AAC) foi identificado em *Neocallimastix* sp. L2 (VONCKEN et al., 2002), assim como outros em *Neocallimastix frontalis* e

ros (HO; ABDULLAH; JALALUDIN, 1988; WUBAH; AKIN; BORNEMAN, 1993). Isolados de fungos zoospóricos foram obtidos do ceco, da saliva e das fezes de vários animais (WUBAH; AKIN; BORNEMAN, 1993).

Em 1981, Joblin relatou que a técnica usada para o cultivo de bactérias anaeróbias se adaptava bem ao estudo destes fungos. Através desta técnica, zoósporos de fungos podem ser contados e os fungos isolados de forma direta do fluido proveniente do rume, sem enriquecimento. Adicionalmente, as culturas podem ser mantidas por períodos longos a 39°C. Bauchop e Mountfort (1981) usaram também fluido do rume, peneirado previamente, para fazer culturas enriquecidas em meio com ágar contendo antibióticos. Após três subcultivos neste meio, a cultura foi transferida para meio líquido e colônias individuais foram coletadas, usando-se uma seringa, e lavadas em tampão. Bactérias metanogênicas, que não haviam sido eliminadas pelo primeiro tratamento com os antibióticos utilizados, eram então removidas por meio do cloranfenicol. Lowe e colaboradores (1985) desenvolveram um método que envolve a utilização de culturas em placa e o uso de meio definido e semidefinido, sem fluido, para crescimento dos fungos do rume.

No ecossistema do rume, tem sido descrita a interação entre fungos anaeróbios e outros microrganismos. Sabe-se que interações ocorrem entre eles e bactérias metanogênicas, não metanogênicas e protozoários (TRINCI et al., 1994; JOBLIN et al., 2002). Bauchop e Mountfort (1981) demonstraram que culturas de *Neocallimastix frontalis* degradavam papel de filtro mais extensivamente na presença de metanógenos do que em sua ausência. Em relação às bactérias não metanogênicas, há uma variedade no rume e acredita-se que as interações com os fungos anaeróbios podem envolver competição, sinergismo ou simbiose. No que diz respeito à interação com os protozoários do rume, acredita-se que, na natureza, esta deva ser de caráter mais complementar do que competitiva (TRINCI et al., 1994).

SUBSTRATOS USADOS E DIVERSIDADE DE ENZIMAS PRODUZIDAS: ENZIMAS INDIVIDUAIS E A POSSÍVEL PRESENÇA DE CELUSSOMAS

Os fungos anaeróbios no rume colonizam materiais de origem vegetal, incluindo, dentre outros, farelo de trigo, palha de arroz, milho, gramas e materiais altamente recalcitrantes, como a madeira (AKIN; BORNEMAN; LYON, 1990; ROGER et al., 1992; TRINCI et al., 1994). Estes fungos degradam rapidamente tais materiais, sendo o açúcar fermentado, com a formação de formato, acetato, lactato, etanol, CO₂ e H₂ como produtos finais principais (LJUNGDAHL et al., 1999).

Os fungos anaeróbios produzem enzimas com grande capacidade para degradar a parede celular de plantas. Tais enzimas incluem celulasas, xilanases, mananases, pectinases, b-glucanases, b-glucosidases, acetil-xilana esterases e esterases fenólicas (BORNEMAN; AKIN; LJUNGDAHL, 1989; LI; CHEN; LJUNGDAHL, 1997; XIMENES, 1999). Algumas enzimas estão presentes de forma individual, enquanto outras são encontradas em um complexo de alta massa molecular. Estudos sobre este complexo indicam que os mesmos são similares aos celussomas presentes em bactérias anaeróbias (FANUTTI et al., 1995; LI; CHEN; LJUNGDAHL, 1997). Esta consideração é sustentada pelo fato de que várias hidrolases possuem domínios de peptídeos repetidos (DPR) entre dois domínios catalíticos ou na região amino- ou carboxiterminal, apesar de tais domínios não apresentarem seqüências homólogas às regiões duplicadas conservadas de proteínas catalíticas celussomais. É importante ressaltar que estas regiões não são requeridas para catálise. Adicionalmente, foi também observado que um domínio de peptídeo repetido de uma xilanase produzida por uma espécie de *Piromyces* liga-se a outras proteínas presentes nos complexos de *Neocallimastix* e *Piromyces* (LI; CHEN; LJUNGDAHL, 1997). Trabalhos recentes têm descrito o isolamento de cDNAs codificando enzimas contendo DPRs, nos quais

quatro sondas foram usadas na seleção de uma biblioteca de cDNA de *Orpinomyces* e *Piromyces*. Diferentes enzimas contendo tais domínios foram isoladas por este procedimento, indicando que estas enzimas são componentes do complexo multiprotéico de alta massa molecular produzidos pelos fungos anaeróbios em estudo (STEENBAKKERS et al., 2001).

É importante mencionar que as atividades específicas das enzimas produzidas por fungos anaeróbios que são expressas em *Escherichia coli* são comparáveis àquelas de outras fontes correspondentes ou até mesmo maiores do que elas (LJUNGDAHL et al., 1999; XIMENES, 1999).

CONCLUSÕES

Os fungos anaeróbios produzem enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas na forma de um

complexo multiprotéico, assim como individualmente. Estas enzimas apresentam uma alta atividade específica, tendo, portanto, grande potencial para aplicação industrial. A presença de domínios de peptídeos repetidos não catalíticos nas enzimas que fazem parte do complexo sugere a existência de uma proteína estrutural, que, no nosso conhecimento, ainda não foi isolada.

Algumas perguntas importantes permanecem à espera de respostas. Por exemplo: Qual a similaridade entre os celulosomas de bactérias e fungos? Que etapas estão envolvidas na síntese e organização do celulosoma fúngico? Se há uma proteína estrutural, qual será a similaridade desta com aquela presente em celulosomas produzidos por bactérias anaeróbias?

Anaerobic fungi

Abstract

The discovery of obligatory anaerobic fungi in the rumen of sheep by Orpin in 1975 has motivated studies on such microorganisms in laboratories, in different parts of the world. Those studies have shown that the anaerobic fungi do not contain mitochondria; instead, they have organelles such as hydrogenosomes, which are involved in energy generation. They produce enzymes that can be found either associated to a multi-protein complex of a high molecular mass, similar to the celulosome produced by anaerobic bacteria, or individually. Different hydrolytic enzymes produced by several species of those fungi, mainly cellulases and hemicellulases, have been isolated and characterized. In general, those enzymes have specific activities similar or higher than others produced by corresponding aerobic sources; therefore, they show great potential for industrial use.

Keywords: *Anaerobic fungi. Hydrogenosomes. Hydrolases.*

REFERÊNCIAS

- AKHAMANOVA, A. et al. Cytosolic enzymes with a mitochondrial ancestry from the anaerobic chytrid *Piromyces* sp. E2. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.30, p.1017-1027, 1998.
- AKHAMANOVA, A. et al. A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.32, p.1103-1114, 1999.
- AKIN, D. E.; BORNEMAN, W. S.; LYON, C. E. Degradation of leaf blades and stems by monocentric and polycentric isolates of ruminal fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v.31, p.205-221, 1990.

- BAUCHOP, T. The gut anaerobic fungi colonizers of dietary fibre. In: WALLACE, G.; BELL, L. (Ed.). **Fibre in human and animal nutrition**. Wellington: Royal Society of New Zealand, 1983. p.143-148.
- BAUCHOP, T.; MOUNTFORT, D. O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the presence and absence of rumen methanogens. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, DC, v.42, p.1103-110, 1981.
- BENCHIMOL, M.; DURAND, R.; ALMEIDA, J. C. A double membrane surrounds the hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.154, p.277-282, 1997.
- BORNEMAN, W. S.; AKIN, D. E.; LJUNGDAHL, L. G. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, DC, v.55, p.1066-1073, 1989.
- BRAUNE, R. Untersuchungen über die im Widerkäuermagens vorkommenden Protozoen. **Arch. Protistenkd.**, Jena, v.32, p.111-170, 1913.
- BROOKMAN, J. L. et al. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. **Microbiology**, Reading, v.146, p.393-403, 2000.
- DAVIDSON, E. et al. An [Fe] hydrogenase from the anaerobic hydrogenosome-containing fungus *Neocallimastix frontalis* L2. **Gene**, Amsterdam, v.296, p.45-52, 2002.
- DYAL, S. D. et al. Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, DC, v.20, p.2488-2497, 2000.
- EMBLEY, T. M.; HORNER, D. S.; HIRT, R. P. Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? **Trends Ecol. Evol.**, Barking, v.12, p.437-441, 1997.
- FANNUTI, C. et al. The conserved non-catalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi as a protein docking domain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.270, p.29314-29322, 1995.
- FENCHEL, T.; FINLAY, B. J. **Ecology and evolution in anoxic worlds**. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- FORSBERG, C. W.; CHENG, K.-J. Molecular strategies to optimize forage and cereal digestion by ruminants. In: BILLS, D. D.; KUNG, S.-D. (Ed.). **Biotechnology and nutrition: proceedings of the third international symposium**. Boston: Butterworth Heinemann, 1992. p.107-147.
- HEATH, I. B.; BAUCHOP, T.; SKIPP, R. A. Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the *Spizellomyces* (*Chytridiomycetes*) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v.61, p.295-307, 1983.
- HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.134, p.177, 1988.
- HO, Y. W.; BARR, D. J. S. Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. **Mycologia**, New York, v.87, p.655-677, 1995.
- JOBLIN, K. N. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, DC, v.42, p.1119-1122, 1981.
- JOBLIN, K. N. et al. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. **Curr. Microbiol.**, New York, v.45, p.46-53, 2002.
- KOPECNY, J.; HODROVA, B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.20, p.312-316, 1995.
- LI, X.-L.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L. G. Monocentric and polycentric anaerobic fungi produce structurally related cellulases and xylanases. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, DC, v.63, p.628-635, 1997.
- LIEBETANZ, E. Die parasitischen Protozoen des Widerkäuermagens. **Arch. Protistenkd.**, Jena, v.19, p.19, 1910.
- LJUNGDAHL, L. G. et al. The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* and aspects of further cellulase research. In: OHMIYA, K. et al. (Ed.). **Genetic, biochemistry and ecology of cellulose degradation**. Tokyo: Uni Publishers, 1999. p.495-506.
- LOWE, S. E. et al. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.131, p.2225-2229, 1985.
- MOUNTFORT, D. O. The rumen anaerobic fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.46, p.401-408, 1987.

- MUNN, E. A.; ORPIN, C. G.; GREENWOOD, C. A. The ultrastructure and possible relationships of four obligate anaerobic Chytridiomycete fungi from the rumen of sheep. **Biosystems**, Limerick, v.21, p.67-82, 1988.
- ORPIN, C. G. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.98, p.423-430, 1977.
- ORPIN, C. G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.91, p.249-262, 1975.
- ORPIN, C. G. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.94, p.270-280, 1976.
- ROGER, V. et al. Degradation of maize stem by two rumen fungal species, *Pivomyces communis* and *Caecomyces communis*, in pure cultures or in association with cellulolytic bacteria. **Reprod. Nutr. Dev.**, Les Ulis, v.32, p.321-329, 1992.
- SELINGER, L. B.; FORSBERG, C. W.; CHENG, K.-J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. **Anaerobe**, London, v.2, p.263-284, 1996.
- STEENBAKKERS, P. J. M. et al. Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. **J. Bacteriol.**, Washington, DC, v.183, p.5325-5333, 2001.
- TRINCI, A. P. J. et al. Anaerobic fungi in herbivorous animals. **Mycol. Res.**, Cambridge, UK, v.98, n.2, p.129-152, 1994.
- VAN DER GIEZEN, M. et al. Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. **EMBO J.**, Oxford, v.21, p.572-579, 2002.
- VAN DER GIEZEN, M. et al. A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.23, p.11-21, 1997.
- VONCKEN, F. et al. Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.44, p.1441-1454, 2002.
- WEBB, J.; THEODOROU, M. K. *Neocallimastix hurleyensis* sp. nov., an anaerobic fungus from the ovine rumen. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v.69, p.1220-1224, 1991.
- WHATLEY, J. M.; JOHN, P.; WHATLEY, F. R. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. **Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.**, London, v.204, p.165-187, 1979.
- WUBAH, D. A.; AKIN, D. E.; BORNEMAN, W. S. Biology, fiber degradation, and enzymology of anaerobic zoosporic fungi. **Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v.19, n.2, p.99-115, 1993.
- XIMENES, E. A. Cloning and sequencing of cDNAs encoding one beta-glucosidase, three cellulases, and one mannanase of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2, and over-expression of the beta-glucosidase and mannanase in *Saccharomyces cerevisiae*. 1999. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1999.
- YARLETT, N. et al. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. **Biochem. J.**, London, v.236, p.729-739, 1986.

Agradecimentos

O autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento de projetos de pesquisa envolvendo estudos sobre microrganismos aeróbios e anaeróbios.