

TÁSSIA CHIACHIO EGEA

**Avaliação do perfil de produção de enzimas e
potencial de degradação do herbicida diuron
pelos fungos isolados de solo de plantação de
cana-de-açúcar**

São José do Rio Preto-SP
Setembro/2010

TÁSSIA CHIACHIO EGEA

**Avaliação do perfil de produção de enzimas e
potencial de degradação do herbicida diuron
pelos fungos isolados de solo de plantação de
cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto, São Paulo.

Co-orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus, Bahia.

São José do Rio Preto-SP

Setembro/2010

TÁSSIA CHIACHIO EGEA

Avaliação do perfil de produção de enzimas e potencial de degradação do herbicida diuron pelos fungos isolados de solo de plantação de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eliana Gertrudes Macedo Lemos
Professor Titular
UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 30 de setembro de 2010

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo conforto espiritual, que me fortalece a cada dia.

À Prof^a. Dr^a Eleni Gomes pela orientação, dedicação, paciência e confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues pela co-orientação e atenção dedicada ao projeto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Almeida pela colaboração, sugestões e apoio para o sucesso desta pesquisa.

Aos companheiros de laboratório, Ana Lúcia, Ariane, Barbara B., Barbara S., Larissa, Ricardo, Thiago, Fabiana, Andréia, Natalia, André, Ruan, Gisele, Milla, Cris, Carol M., Carol B., Ellen, Aline, Josiane, Isabel, Marcelo e Daniela, pelo carinho e ajuda nas horas de trabalho.

À minha linda família pelo amor e apoio para concretizar mais esse sonho.

À minha Vó Alice pelas incessantes orações que me abençoaram durante esta caminhada.

Às amigas, em especial Ana Lúcia, Barbara, Juliana e Fernanda pela compreensão, carinho e amizade sincera.

Ao meu companheiro Léo pela paciência e orações, que tanto me ajudaram a concretizar esse trabalho.

À Açucareira Virgulino de Oliveira por disponibilizar a área para realização dessa pesquisa.

À CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Diversidade microbiana e qualidade ambiental	2
2.2 Setor sucroalcooleiro e seus impactos	4
2.3 Biorremediação de xenobióticos	7
2.4 Herbicida diuron	10
2.5 Enzimas fúngicas	16
2.5.1 Xilanase	16
2.5.2 Celulase	19
2.5.3 Lacase	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Meio de cultura	26
4.1.1 Meio líquido para isolamento das linhagens fúngicas	26
4.1.2 Meio sólido para isolamento das culturas	26
4.1.3 Armazenamento da coleção	27
4.2 Localização e caracterização das áreas de coletas	27
4.3 Coletas – locais e períodos	29
4.4 Identificação dos isolados	31
4.5 Fermentação em estado sólido	31
4.6 Determinação da atividade enzimática	33
4.6.1 Xilanase e Carboximetilcelulase (CMCase).....	33
4.6.2 Lacase	33

4.7	Herbicida diuron	33
4.8	Fermentação submersa	34
4.9	Avaliação da degradação do herbicida em HPLC.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Isolamento e identificação	36
5.2	Análise da distribuição dos espécimes	37
5.2.1	Distribuição por área de coleta	37
5.2.2	Distribuição por coleta	40
5.2.3	Distribuição por fonte de carbono usado no meio de isolamento	42
5.3	Atividade enzimática	43
5.3.1	Atividade de xilanase	43
5.3.2	Atividade de CMCase	45
5.3.3	Atividade de lacase	48
5.3.4	Considerações sobre as atividades enzimáticas.....	50
5.4	Análise de biodegradação do herbicida diuron em HPLC	50
5.4.1	Teste de degradação espontânea	50
5.4.2	Degradação do diuron pelos isolados	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7	CONCLUSÃO	59
8	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural do diuron (MONCADA, 2005)	12
Figura 2:	Degradação química do diuron (Fonte: SALVESTRINI, Di CERBO, CAPASSO, 2002)	14
Figura 3:	Vias metabólicas de degradação bacteriana de diuron e 3,4 dicloroanilina (Fonte: Modificado de GIACOMAZZI & COCHET, 2004)	15
Figura 4:	Degradação do polímero de hemicelulose por enzimas microbinas (Fonte: BEG et al., 2001)	18
Figura 5:	Composição da fibra vegetal (Fonte: SILVA, GROSSMAN, DURRANT, 2009)	20
Figura 6:	Ciclo catalítico das lacases evidenciando sua atuação direta sobre substratos fenólicos (BALDRIAN, 2006)	23
Figura 7:	Mecanismo de reação lacase-med (BRANCHI, GALLI, GENTILLI, 2005).	23
Figura 8:	Diferentes épocas do cultivo da cana de açúcar	29
Figura 9:	Locais de coleta na área de isolamento.....	30
Figura 10:	Frasco de coleta.....	30
Figura 11:	Esquema de fermentação em estado sólido e extração de enzima.....	32
Figura 12:	Sacos para fermentação sólida.....	32
Figura 13:	Fermentação submersa.....	34
Figura 14:	Distribuição dos isolados por gênero.....	36
Figura 15:	Comportamento do diuron em ausência de fungo.....	51
Figura 16:	Perfis cromatográficos do meio de fermentação, diuron e seu produto	53
Figura 17:	Perfis cromatográficos da degradação do diuron e consumo de meios de cultura pelos fungos isolados, em diferentes tempos.....	56
Figura 18:	Cromatograma típico de HPLC (detecção UV, 252 nm) indicando o diuron e seus metabólitos (Fonte: FIELD, 1997).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Prazo para eliminação da queima da cana em áreas com declividade inferior a 12%.....	6
Tabela 2:	Prazo para eliminação da queima da cana em áreas com declividade superior a 12%.%.....	6
Tabela 3:	Herbicidas utilizados em plantação de cana de açúcar	11
Tabela 4:	Características da área ao longo do período de coleta	27
Tabela 5:	Características das áreas de coleta.....	28
Tabela 6:	Cronograma de coleta	29
Tabela 7:	Gêneros dos isolados (por área de coleta)	38
Tabela 8:	Gêneros dos isolados (por coleta)	40
Tabela 9:	Distribuição dos isolados por fonte de carbono usado no meio de isolamento	42
Tabela 10:	Atividade máxima de xilanase dos isolados	44
Tabela 11:	Atividade máxima de CMCase dos isolados	46
Tabela 12:	Atividade máxima de lacase dos isolados	49
Tabela 13:	Porcentagens máximas de degradação pelos isolados selecionados	54

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1:	Índice de Sorensen	38
------------	--------------------------	----

RESUMO

Para o setor industrial, o isolamento e identificação de microrganismos com habilidade em produzir biocatalisadores é de grande importância para a apresentação de novas fontes de enzimas ao mercado. O isolamento é uma das ferramentas mais utilizadas na seleção de microrganismos, proporcionando o levantamento de espécies capazes de metabolizar compostos químicos potencialmente tóxicos, sendo essenciais na biorremediação, pois atuam como medida mitigadora para os problemas decorrentes do uso irracional de agrotóxicos. Neste trabalho, foram isoladas 75 linhagens fúngicas de solo de plantação de cana de açúcar, por diferentes fontes de carbono, em diferentes épocas do cultivo e em duas áreas de coleta – solo com e sem a queima da palha – para o estudo do potencial de produção enzimática e de degradação do herbicida diuron. Dentre os isolados, encontrou-se 10 gêneros diferentes, sendo a maioria referente ao gênero *Trichoderma* (40%), seguido de *Fusarium* (15%), *Cunninghamella* (13%) e *Aspergillus* (12%). Da quantidade total de fungos isolados, 56% foram oriundos do solo de queimada e 44% do solo sem queima. Os gêneros *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Fusarium* e *Trichoderma* foram os gêneros encontrados em todos os meios de isolamento, como também os mais constantes, sendo os dois últimos, os únicos a serem encontrados em todas as coletas. Os isolados foram submetidos à fermentação do estado sólido, contendo bagaço de cana e farelo de trigo como substratos, para estudo da produção de xilanase, CMCase e lacase. A atividade das enzimas pelos isolados fermentados foi bastante variada, com produção de xilanase atingindo valores máximos de 64,0 U/mL (*Aspergillus*) e 63,7 U/mL (*Aspergillus*), a produção de CMCase foi de 5,5 U/mL (*Fusarium*) e 4,2 U/mL (*Aspergillus*) e lacase de 0,50 U/mL (*Verticillium*) e 0,27 U/mL (*Fusarium*). Dos 74 isolados, 23 foram selecionados para verificação do potencial de degradação do herbicida diuron. Todos os microrganismos selecionados apresentaram taxas de degradação do herbicida em questão, destacando o gênero *Aspergillus* como sendo o de maior potencial (47,7% por pico produto e 67,1 por concentração), no período estudado.

ABSTRACT

The isolation and identification of microorganisms with ability to produce biocatalysts is a great method for the presentation of new sources of enzymes to the industry. Isolation is one of the most used tools in the selection of microorganisms, providing a survey of species able to metabolize potentially toxic chemical compounds. In this study, 75 fungal strains were isolated from soil of plant sugar cane from different carbon sources, at different times of cultivation and collecting in two areas - soil with and without straw burning - to study the enzyme activity and degradation of the herbicide diuron. Among the isolates, were found 10 different genres, mostly related to the genus *Trichoderma* (40%), followed by *Fusarium* (15%), *Cunninghamella* (13%) and *Aspergillus* (12%). Of the total isolates, 56% came from the soil of burned and 44% of the ground without burning. The genera *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Fusarium* and *Trichoderma* were the genera found in all media of isolation, and the last two were the only ones to be found in all samples. The isolates were subjected to solid-state fermentation, containing sugar cane bagasse and wheat bran as substrates to study the production of xylanase, CMCcase and laccase. The activity of enzymes by the fungus fermentation was quite varied, with xylanase production reached maximum values of 64.0 U/mL (*Aspergillus*) and 63.7 U/mL (*Aspergillus*), the production of CMCcase was 5.5 U/mL (*Fusarium*) and 4.2 U/mL (*Aspergillus*) and laccase from 0.50 U/mL (*Verticillium*) and 0.27 U/mL (*Fusarium*). Of the 74 isolates, 23 were selected for verification of the potential degradation of the herbicide diuron. All selected microorganisms showed higher degradation of the herbicide in question, and the genus *Aspergillus* had the most promising degradation (47.7% for peak product and 67.1 per concentration) in the period studied.

1 INTRODUÇÃO

A preservação da microbiota é considerada um requerimento fundamental para a manutenção da qualidade de solo. No entanto, tem-se comprovado que as práticas de manejo associadas à intensificação da agricultura, como queima da palha da cana e principalmente a utilização de pesticidas, podem alterar expressivamente a funcionalidade da microbiota, tanto na quantidade e diversidade como na atividade dos microrganismos.

O estudo da microbiota do solo proporciona um conhecimento prévio da relação entre sua alteração com as mudanças das características do local. A diferença no comportamento microbiano corresponde a possíveis alterações ocorridas no meio, sendo, em muitos casos, utilizados como bioindicadores de estresses ambientais.

Estudos realizados com base no uso de microrganismos para degradar compostos químicos são descritos frequentemente na literatura, bem como a degradação total ou parcial de agrotóxicos por populações microbianas naturais presentes em solos. Os estudos em laboratório constituem uma primeira etapa de importante valor exploratório, sendo uma forma eficiente de revelar rapidamente o potencial dos microrganismos, mesmo sendo difícil projetar a multiplicidade de fatores que atua nas condições reais.

O ataque de compostos aromáticos por microrganismos ou por suas enzimas livres no meio podem levar ao desejável processo de biodegradação, originando derivados quimicamente mais simples e menos tóxicos até a mineralização total do composto. Por outro lado, a ação microbiana sobre compostos clorados, como é o caso do diuron, pode seguir vias de transformação com reações de substituição por halogênios, demetilação ou hidrólise do composto, formando produtos que podem ter maior potencial tóxico quando comparado com o composto original.

Tendo em vista essas considerações, propôs-se isolar fungos filamentosos mesofílicos de solo de plantação de cana-de-açúcar para o estudo do potencial de produção enzimática e capacidade de biotransformação/biodegradação do herbicida diuron pelos mesmos, para avaliação de possíveis aplicações em processos de biotecnologia e biorremediação, respectivamente.

2 REVISAO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIVERSIDADE MICROBIANA E QUALIDADE AMBIENTAL

Por muitos anos, acreditava-se que a qualidade do solo estava relacionada somente com sua fertilidade e do que dele poderia ser extraído (KARLEN, DITZLER, ANDREWS, 2003). Caracterizava-se um solo com boa qualidade aquele que se apresentasse quimicamente rico, pois assim era capaz de prover a produção agrícola. Entretanto, com o passar dos anos percebeu-se que não apenas era necessário o solo apresentar uma boa fertilidade, mas, sim apresentar boa estruturação e diversidade de organismos (ZILLI et al., 2003).

Ecologicamente, o solo é composto de rizosfera, onde se apresentam as raízes das plantas; a termitosfera, ambiente habitado por cupins; drilosfera, ambiente habitado por minhocas; rachaduras, ambiente influenciado por condições edafoclimáticas, entre outros (ZILLI et al., 2003). A atividade metabólica do solo é muito influenciada pela presença das raízes, pois representam as maiores fontes de carbono prontamente disponíveis para os microrganismos e também pela presença de matéria orgânica em decomposição (GRAYSTON & JONES, 1996).

A microbiota do solo apresenta uma grande importância para os processos vitais do ecossistema edáfico (CHILSDS, 2007) pois são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, fixação de nitrogênio atmosférico, fluxo de energia, solubilização de uma série de compostos essenciais, como o fósforo, decomposição de xenobióticos e, também, controle biológico de pragas e doenças de plantas (MOORMAM, 1994; SPOSITO & ZABEL, 2003). Assim, a biomassa microbiana é considerada a parte viva da matéria orgânica do solo e a manutenção da sua capacidade metabólica é considerada como um processo fundamental para a preservação da capacidade produtiva do mesmo (GAMA-RODRIGUES, 1999).

A diversidade de microrganismos do solo é tão vasta quanto desconhecida, na qual um grama de solo pode conter 10^6 a 10^7 microrganismos, representando milhares de espécies. Acredita-se que foram descobertas e nomeadas até o presente momento, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas, dependendo do habitat estudado (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). Isso se deve, pois, até pouco

tempo atrás, os microrganismos eram identificados mediante cultivo prévio (PACE, 1986) sendo a frequência de ocorrência das populações, a sazonalidade e a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e multiplicação fatores limitantes para encontrá-los no ambiente (TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Entretanto, metodologias baseadas no estudo do DNA, como a metagenômica, vêm sendo desenvolvidas para análise da diversidade microbiana dos solos (SANDAA, ENGER, TORSVIK, 1998; TORSVIK et. al., 1998), garantindo encontrar variadas espécies de microrganismos, sendo até mesmo encontradas espécies antes nunca cultivadas em laboratório (TORSVIK, GOKSØYR, DAAE, 1990). Assim, a metagenômica atua como uma ferramenta de acesso à diversidade microbiana total, permitindo estudar uma microbiota não-cultivável, que representa a maior parte da diversidade bacteriana, por exemplo (RAPPE & GIOVANNONI, 2003).

Outro fator que interfere no cultivo e identificação de microrganismos são os problemas ambientais ligados à atividade humana como transformação de zonas florestais em áreas agrícolas, degradação de terras produtivas e intenso uso de defensivos agrícolas. Essas atividades alteram expressivamente o tamanho e a composição das comunidades de microrganismos (PAUL & CLARK, 1996; LAL, 1998), interferindo diretamente na qualidade produtiva do local (POWLSON et al., 1987).

Para obter o conhecimento da microbiota local, processos de isolamento são realizados, objetivando retratar fielmente a comunidade de microrganismos presentes. O isolamento e cultivo de microrganismos são ferramentas do estudo da biogeografia do ambiente, pois determinam a diversidade microbiana local como também a identificação de táxons ameaçados de extinção (STALEY & GOSINK, 1999). Para o contexto de bioprospecção e biotecnologia, a biogeografia microbiana pode representar um componente essencial no processo de busca e descoberta de novos microrganismos com potencial para aplicação industrial (CANHOS & MANFIO, 2001).

O conhecimento da biogeografia local permite isolar microrganismos a partir de áreas contaminadas, que podem facilitar a seleção de agentes despoluidores eficientes para os estudos de biorremediação, como observado por Silva Jr. & Pereira (2007) que isolaram 18 fungos de solo de área de deposição industrial contaminado por metais pesados. Colla et al. (2008) isolaram 15 fungos de solo contaminado por herbicidas triazinicos e Souza et al. (2005) isolaram microrganismos degradadores de derivados de petróleo em águas contaminadas.

O estudo e monitoramento da microbiota é uma ferramenta que contribui para avaliar o sucesso de trabalhos de reparo de áreas degradadas e para estabelecer estratégias de restauração de solos modificados. As perturbações no solo, devido aos impactos ambientais, causam mudanças drásticas na diversidade taxonômica e funcional das comunidades presentes, e os efeitos desse estresse podem ser detectados pela mudança comportamental e funcional da microbiota (DEGROOD, CLAASSEN, SCOW, 2005). A preocupação mundial com a biodiversidade está em constante discussão, tornando crescente a necessidade de programas que façam o seu mapeamento e planejem a sua preservação e exploração econômica (GARCIA, 1995).

A diversidade microbiana, assim como suas propriedades biológicas (biomassa microbiana e atividade de enzimas na ciclagem dos nutrientes) tem sido bastante discutidos como indicadores da qualidade dos solos, principalmente com o surgimento e aprimoramento de técnicas de biologia molecular, porém pouca pesquisa tem sido feita para relacionar a diversidade microbiana e dinâmica dos solos (JOHNSON, LEE, SCOW, 2003; SILVEIRA & FREITAS, 2007).

2.2 SETOR SUCROALCOOLEIRO E SEUS IMPACTOS

A produção sucroalcooleira no Brasil foi estimulada, por volta da década de 70, com a criação do Programa Nacional do Alcool (Pró-Alcool) do qual objetivava a substituição em larga escala do uso dos combustíveis veiculares derivados de petróleo pelo álcool. A presença de um clima adequado, a extensa quantidade de terra disponível e o solo fértil para a produção de cana-de-açúcar contribuiu para um crescimento ligeiro do cultivo da cana, dando uma posição de liderança para o país na produção e na exportação de açúcar de cana, sendo cerca de dois terços de todo o açúcar produzido nas terras brasileiras destinados ao mercado internacional (MENDONZA et al., 2000; ESBERARD, CHAIM, TUROLLA, 2009). As usinas de açúcar e álcool movimentam bilhões por ano no país (2,3% do PIB nacional), além de ser um dos setores que mais empregam no País (ESBERARD, CHAIM, TUROLLA, 2009; MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2009).

O Brasil conta com 248 fábricas mistas (produção de açúcar e etanol), 156 fábricas exclusivas para produção de etanol e 15 exclusivas para fabricação de açúcar, segundo levantamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em

03/07/2009. O país moeu na safra 2007/2008, segundo dados da União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo – UNICA, um volume de 496 milhões de toneladas de cana de açúcar, crescimento expressivo de 16% ante a safra anterior e produziu 31 milhões de toneladas de açúcar e 22,5 milhões de metros cúbicos de álcool. Para a safra de 2008/2009, o país moeu um volume recorde de 569 milhões de toneladas de cana de açúcar, produzindo 31 milhões de toneladas de açúcar e 27 milhões de metros cúbicos de álcool, tendo um crescimento de 14% ante a safra anterior

O crescimento do setor sucroalcooleiro e a elevada instalação de novas usinas aumentaram ainda mais a preocupação não só com a qualidade do meio ambiente, mas também trouxe preocupações aos setores agrônômicos, socioeconômicos e legais (ESBERARD, CHAIM, TUROLLA, 2009). Entre os problemas ambientais causados pelas usinas, Barbosa, 2006, aponta a destruição do potencial hídrico como sendo um deles. A renovação da lavoura de cana de açúcar origina-se da brota da planta, que por sua vez ocorre somente com a ajuda de irrigação do solo. Para a irrigação, é usado o sistema de jateamento de água, que leva a água até o campo através de tubulações móveis com o auxílio de motores potentes, movidos à óleo diesel às margens dos rios. No período da estiagem o volume de água dos rios sofre uma diminuição natural e reduz-se em muito o potencial hídrico desses cursos de água, provocando a secagem da orla dos rios que dão origem aos brejos. Esse processo de irrigação se repete durante todos os anos e com a expansão da área cultivada, o problema vem se agravando, ameaçando cada vez mais, o potencial hídrico (BARBOSA, 2006).

Além da irrigação, o uso de agrotóxicos também compromete a qualidade das águas, pois após aplicados, percolam pelo solo podendo alcançar lençóis freáticos, comprometendo todo um ciclo de águas e, por conseguinte, contaminando também todo o ecossistema que depende dessa água para sobreviver (ARMAS et al., 2005).

Outro problema apontado por Barbosa, 2006, decorrente dessa monocultura é o comprometimento do cerrado. O terreno ideal para o plantio de cana, geralmente, é encontrado no cerrado, sendo necessária a “limpeza” do terreno para sua utilização. Esse processo muda a paisagem natural da região, podendo dificultar a recuperação da vegetação nativa.

Apesar da destruição dos recursos hídricos e o comprometimento do cerrado despertar grande preocupação com a questão ambiental, o problema mais discutido ultimamente tem sido a queima da palha da cana para a sua colheita. Referente a esse assunto, a preocupação com a qualidade ambiental pelo governo antecipou o prazo do

cumprimento do Protocolo Agro-Ambiental de 2021 para 2014, proibindo a queima da palha da cana pelas usinas (ESBERARD, CHAIM, TUROLLA, 2009). O decreto de Lei Estadual 47.700, de 11 de março de 2003, regulamenta a Lei Estadual 11.241, de 19 de setembro de 2002, determina prazos para a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar nos canaviais paulistas, estabelecendo prazos, procedimentos, regras e proibições que visam a regulamentar as queimas em práticas agrícolas (SOUZA et al., 2005). Esta lei estabelece, em seu Artigo 2º, que em áreas com declividade inferior a 12%, 50% da queima da cana terá que ser eliminada até o ano de 2011 e em 2021 a queima será proibida (Tabela 1). Nas áreas com declividade superior a 12%, o prazo se estende até 2031 (Tabela 2).

Tabela 1: Prazo para eliminação da queima da cana em áreas com declividade inferior a 12%.

ANO	ÁREA MECANIZÁVEL ONDE NÃO SE PODE EFETUAR A QUEIMA DA QUEIMA	PERCENTAGEM DE ELIMINAÇÃO
1º ano (2002)	20% da área cortada	20% da queima eliminada
5º ano (2006)	30% da área cortada	30% da queima eliminada
10º ano (2011)	50% da área cortada	50% da queima eliminada
15º ano (2016)	80% da área cortada	80% da queima eliminada
20º ano (2021)	100% da área cortada	Eliminação total da queima

Fonte: São Paulo, Lei N° 11.241

Tabela 2: Prazo para eliminação da queima da cana em áreas com declividade superior a 12%.

ANO	ÁREA NÃO MECANIZÁVEL, COM PERCENTAGEM DE ELIMINAÇÃO DECLIVIDADE SUPERIOR A 12% E/OU DA QUEIMA MENOR DE 150ha (cento e cinquenta hectares)	ONDE NÃO SE PODE EFETUAR A QUEIMA
10º ano (2011)	10% da área cortada	10% da queima eliminada
15º ano (2016)	20% da área cortada	20% da queima eliminada
20º ano (2021)	30% da área cortada	30% da queima eliminada
25º ano (2026)	50% da área cortada	50% da queima eliminada
30º ano (2031)	100% da área cortada	100% da queima eliminada

Fonte: São Paulo, Lei N° 11.241

Levantamento do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) aponta que, entre abril e maio, os dois primeiros meses da safra 2009/2010, a colheita mecânica foi feita em 62% da área de cana no Centro-Sul e 67% da área paulista. No mesmo período da safra passada, a colheita mecânica atingiu 53% no Centro-Sul e 57% em São Paulo. Os destaques entre os estados com maior mecanização da colheita da cana de açúcar até maio são Goiás e São Paulo (67%), Mato Grosso do Sul (64%) e Minas Gerais (53%).

O destaque negativo é o estado do Paraná, segundo maior produtor de cana do País, cujas lavouras de 16 unidades avaliadas apresentaram um percentual de queima da palha de 97% até maio, mantendo-se estável em relação a igual período do ano anterior, e onde a colheita mecânica atingiu 22% das lavouras, ante 15% em igual período de 2008/2009 (BOLETIM INFOSUCRO, 2009).

A queima prévia da cana de açúcar aumenta a produtividade do trabalhador pois evita a retirada da palha, haja vista que em média uma pessoa pode cortar até 12 toneladas/dia de cana queimada, e sem a queima da palha esse volume cairia para 3 toneladas/dia (ESBERARD, CHAIM, TUROLLA, 2009). A queima é uma ação menos poluente que a queima de combustível fóssil e quanto comparada com a fotossíntese, estudos mostraram que um hectare queimado de cana libera o equivalente a menos de uma tonelada de CO₂, enquanto a fotossíntese realizada pela cana durante todo o seu ciclo de crescimento retira 15 toneladas do gás do meio ambiente, gerando um balanço altamente positivo (MARQUES, 2009). Entretanto esse processo ocasiona o empobrecimento do solo (URQUIAGA, et al., 1991), poluição do ar pela emissão de gases (RIBEIRO, 2008), diminuição do volume de resíduos de fins energéticos (palha e bagaço), além de lançar uma grande quantidade de fuligem sobre as cidades próximas às lavouras (CAMARGO, et al., 2008).

Ainda assim, o setor sucroalcooleiro segue em grande expansão, trabalhando em consonância com as legislações ambientais para eliminar gradativamente os impactos causados pela monocultura (MARQUES, 2009).

2.3 BIORREMEDIAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

Ao mesmo tempo em que o emprego de agrotóxico trouxe benefícios para a agricultura, o seu uso indiscriminado trouxe, também, problemas muito sérios para a população e o meio ambiente (LISBOA, SENA, DUTRA, 2007). Após aplicação do produto químico, a sua localização não se limita somente ao local aplicado, podendo ocorrer seu transporte por vento, chuva, lixiviação e escoamento superficial, contaminando outras áreas, além de poluir, por exemplo, águas superficiais (GOLOVLELA et al., 1992; VELASCO & CAPANEMA, 2006). O setor agrícola contribui também com a poluição ambiental devido às aplicações em doses não recomendadas (superdosagens) dos produtos agroindustriais, e outras vezes pelo

lançamento inadequado, em ambientes, de soluções aquosas resultantes de lavagens de tanques de estocagem (CHEN & MULCHANDANI, 1998).

Inicialmente, os tratamentos de resíduos perigosos foram realizados com base em métodos físico-químicos como aterro e isolamento, incineração, sedimentação, filtração, separação por solventes e diálise (FREIRE et al., 2000). Posteriormente, novas técnicas foram desenvolvidas, como a utilização de processos oxidativos avançados, ultrafiltração e osmose reversa para conter ou degradar espécies químicas nocivas, porém essas técnicas exibem limitada eficiência na eliminação de resíduos, podendo gerar subprodutos com propriedades toxicológicas mais elevadas que o produto de origem (MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004).

Como alternativa aos tratamentos de resíduos químicos em ambientes contaminados, a biodegradação natural pode ser utilizada na maioria dos solos, sendo os fatores de maior importância a disponibilidade do composto e a presença de microrganismos aptos a degradá-los. Deste modo, a biorremediação consiste na participação de microrganismos, em geral envolvendo o sistema enzimático que, bioquimicamente, utiliza o agrotóxico como nutriente e fonte de energia (GIANFREDA, MORA, DIEZ, 2006; UETA, et al., 1999). O processo de biorremediação apresenta vantagens com relação aos processos físicos e químicos pois apresenta um custo reduzido de implementação e operação; a minimização na geração de subprodutos (TIMMIS & PIEPER, 1999) e a possibilidade de tratamento dos resíduos *in situ*, dispensando procedimentos de remoção das camadas superficiais do local (EERD et al., 2003; GIANFREDA & RAO, 2004; MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004).

Dentre os assuntos de biorremediação, biodegradação e biotransformação definem os objetivos dentro da área na descrição dos metabolismos. De acordo com Hurst et al. (1997), biotransformação consiste na alteração da estrutura química do composto, podendo afetar a toxicidade e a mobilidade da molécula no meio. Biodegradação, por sua vez, é o processo metabólico que implica a ruptura total de um composto orgânico em seus componentes inorgânicos, um processo normalmente conhecido como mineralização, levando a formação de CO₂, água e elementos básicos.

O uso de microrganismos naturais, ou seja, provenientes do próprio local impactado para degradar compostos químicos é bastante descrito na literatura (ESPOSITO, PAULILLO, MANFIO, 1998; DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2004; BATTISSON et al., 2007). Porém, poucos herbicidas têm demonstrado ser suscetíveis à mineralização por culturas puras de microrganismos. Isto se deve, provavelmente, ao

fato de que a maior parte dos herbicidas contém uma variedade de grupos estruturais, que requerem diferentes sistemas catabólicos enzimáticos normalmente não encontrados dentro de um único organismo. Conseqüentemente, consórcios de microrganismos podem ser mais eficazes na degradação / mineralização dos poluentes em contraste com cepas individuais (ESPOSITO, PAULILLO, MANFIO, 1998).

O metabolismo da microbiota local determina a estratégia para o processo de biorremediação a ser utilizado. Caso o ambiente apresente organismos metabolicamente ativos contra o xenobiótico, uma pequena adequação das propriedades físico-químicas do meio pode ser suficiente para estimular a atividade microbiana e acelerar o processo de transformação natural do composto. Este processo é conhecido como bioestimulação e é uma das técnicas de biorremediação mais utilizadas (HEAD, 1998). Outra técnica possivelmente utilizada no processo de biodegradação é a bio-aumentação, consistindo na adição de culturas microbianas pré-cultivadas para executar uma tarefa de correção específica em um determinado ambiente (D'ANNIBALE et al., 2006). Essas culturas microbianas devem ter a capacidade de suportar diferentes condições de solo e ambiente para sobreviver na presença de outros microrganismos (RISER-ROBERTS, 1998).

A maioria dos estudos de bio-aumentação foi realizada utilizando fungos filamentosos do solo inoculados em sistemas modelo e com contaminantes de baixo peso molecular como a maioria dos herbicidas e os HPAs (hidrocarbonetos poli-aromáticos) com até quatro anéis (D'ANNIBALE et al., 2006). O interesse nesses microrganismos está na sua capacidade de sintetizar enzimas relativamente inespecíficas que podem degradar além dos compostos de baixo peso molecular, degradar também os de alto peso molecular, complexos e recalcitrante, incluindo estruturas aromáticas (COLOMBO, CABELLO, ARAMBARRI, 1996). Privilegia-se a utilização de microrganismos nativos da região, evitando eventuais impactos resultantes da introdução de espécies exóticas (RITTMANN & McCARTY, 2001).

Canna-Michaelidou & Nicolaou (1996) estudaram os efeitos tóxicos e genotóxicos do diuron em fungos e bactérias. A bactéria *Acinetobacter baumannii* demonstrou capacidade para crescer e utilizar o herbicida diclorometil como fonte de carbono e energia. Sob condições aeróbicas, os microrganismos realizam sucessivas demetilações do grupo uréia, pertencente à molécula de diuron e posteriormente a hidrólise, dando origem à anilina clorada.

2.4 HERBICIDA DIURON

No Brasil, a expansão de área plantada de cana-de-açúcar é acompanhada pelo aumento no consumo de insumos específicos para a cultura. O crescimento da área plantada e a queda dos preços dos insumos agrícolas em 2009 favoreceram o aumento do uso de defensivos para agricultura na safra 2009/2010. De acordo com levantamento divulgado pela Associação Nacional dos Distribuidores de Insumos Agrícolas e Veterinários (ANDAV), as vendas de defensivos tiveram incremento de 10% em relação à safra 2008/2009, mas o montante do faturamento recuou em torno de 10% devido à queda nos preços dos insumos

Os agrotóxicos são divididos em diferentes classes, dentre as quais pode-se citar herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas (COUTINHO et al., 2005). Em 2009, foram comercializadas 725 mil toneladas de produtos formulados. As principais classes são os herbicidas com 59%, seguido por inseticidas (21%), acaricidas (12%), fungicidas e outros (8%). O mercado de defensivos agrícolas no Brasil, em 2009, foi de US\$ 6,6 bilhões (R\$ 12,9 bilhões), 7% a menos que 2008 (MENTEN et al., 2010). Deste valor, o mercado de herbicidas representou 38% (US\$ 2,5 bilhões), tanto para as atividades agrícolas intensivas como tradicionais (FARIA, FASSA, FACCHINI, 2007; MENTEN et al., 2010).

Os herbicidas são compostos xenobióticos de diversos grupos químicos, usados para prevenir a interferência das plantas daninhas, principalmente no início do ciclo, período durante o qual as plantas daninhas causam normalmente as maiores perdas nas culturas. Sua eficácia está relacionada às características físico-químicas e biológicas do solo, sendo classificados como pré e pós emergentes (OLIVEIRA Jr., 2001):

- **Herbicidas aplicados em pré-emergência (PRÉ):** A aplicação do herbicida é feita após a semeadura ou plantio, mas antes da emergência da cultura, das plantas daninhas ou de ambas. Para este tipo de aplicação, o produto depende da umidade do solo, da água da chuva ou de irrigação para atuar. Normalmente estes produtos atuam sobre processos como a germinação de sementes ou o crescimento radicular. Ex: napropamide, alachlor, diuron.
- **Herbicidas aplicados em pós-emergência (PÓS):** Para a aplicação em pós-emergência, a planta deve ter uma boa tolerância à exposição direta ao herbicida,

pois o produto deve ser absorvido em maior parte via foliar. Aplicações normalmente são feitas, geralmente, no início do crescimento das invasoras. Embora variável entre plantas, este estágio geralmente compreende a fase até 3-4 folhas para as dicotiledôneas e antes ou até o início do perfilhamento para gramíneas.

A Tabela 3 apresenta o princípio ativo, dose, modo de aplicação e grupo controlado pelos herbicidas mais utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

Tabela 3: Herbicidas utilizados em plantação de cana-de-açúcar.

Princípio ativo (em inglês)	Dose de ingrediente ativo/ha (kg)	Modo de aplicação	Grupo controlado
2,4 D	0,40 – 0,72	Pós	Latifoliadas
Acetochlor	1,8 – 3,60	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Ametrina	2,00 – 400	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Ametrina + 2,4 D	0,21 + 0,29	Pós, pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Ametrina + Clomazone	2,50 – 3,00	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Ametrina + Diuron	(0,62 – 1,24) + (0,96 – 1,92)	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Clomazone	0,50	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Diuron	1,60 – 3,2	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Diuron + Hexazinone	0,4 – 0,5 + ,0,06 – 0,1	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Diuron + MSMA	0,14 – 0,36	Pós	Gramíneas e latifoliadas anuais
Diuron + Terbutiuron	2,10 – 2,80	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Glyphosate	0,18- 2,16	Pós	Gramíneas e latifoliadas anuais
Metalachlor	2,88 – 3,84	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Metribuzim	0,72	Pré	Latifoliadas
Halosulfuron	0,75	Pós	cyperaceas
Imazapyr	0,25	Pré	Gramíneas perenes e cyperaceas
Isoxaflutole	0,75	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Oxyfluorfen	0,24	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais
Sulfosate	0,48	Pós	Gramíneas e latifoliadas anuais
Sulfentrazone	1,20 – 160	Pré	Gramíneas anuais e perenes e cyperaceas
Terbutiuron	050 – 0,80	Pré	Gramíneas e latifoliadas anuais

Fonte: BLANCO, 2003.

A longa persistência dos herbicidas no ambiente tem contribuído para estudos de impacto ambiental no campo, principalmente em áreas agrícolas sobre mananciais utilizados para o consumo humano (UETA et al. 1999). O destino de herbicidas no ambiente é governado por processos de retenção, transformação e transporte, que

sofrem a interferência das diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, nas características e condições ambientais, condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização do solo na topografia, práticas de manejo dos solos e a taxa e a quantidade de água movendo na superfície (SPADOTTO, 2002).

O uso dos herbicidas pode causar sérios efeitos prejudiciais ao ecossistema, devido ao seu efeito tóxico aos organismos não-alvo. A biota aquática está sujeita a esse tipo de contaminação, devido à lixiviação e ao escoamento de água das áreas tratadas (BRETAUD, TOUTANT, SAGLIO, 2000). Nebeker & Schuytema (1998) estudaram o efeito crônico do diuron em peixes e invertebrados e observaram que a sobrevivência e reprodução de *Daphnia pulex* foi comprometida significativamente quando a concentração de diuron na água atingiu valores de 7,7 mg/L, sendo a toxicidade do diuron já observada na concentração de 1,4 mg/L, de acordo com os dados da Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ (2004).

O diuron é um herbicida indicado para o controle de plantas daninhas, sendo intensivamente aplicado na cultura de cana-de-açúcar, mas também é utilizado em culturas de algodão, abacaxi, alho, cebola, seringueira, café, chá, cacau, batata, entre outros (MUSUMECI et al., 1995; RODRIGUES & ALMEIDA, 1998). Possui nome científico N-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetiluréia e fórmula $C_9H_{10}Cl_2N_2O$, e pertence à família química das fenilamidas, subclasse das feniluréias, e à classe toxicológica III (medianamente tóxico), sendo muitas vezes usado em combinação com outros herbicidas (TOMAZ, 2003; GIACOMAZZI & COCHET, 2004; MONCADA, 2005). A estrutura química do diuron é apresentada na Figura 1.

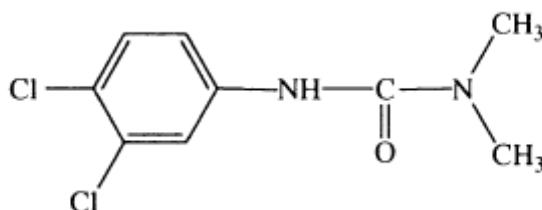


Figura 1: Fórmula estrutural do diuron (MONCADA, 2005).

O diuron (CAS N° 330-54-1) possui meia vida no solo de 372 dias, tem fracas tendências de adsorção e volatilização ($K_{oc} = 499,00$; pressão de vapor: 0,009 mPa a

25°C e constante de Henry de $5,1 \cdot 10^{-5}$ Pa m³mol/L), e como outras feniluréias, apresenta baixa solubilidade em água (42,0 mg/L a 25°C), sendo, portanto, mais facilmente lixiviado em solos com baixo teor de matéria orgânica (GIACOMAZZI & COCHET, 2004; TIXIER et al., 2000). A atividade do diuron afeta plantas, algas e cianobactérias, pois inibe o transporte de elétrons nas membranas fotossintéticas, competindo com a plastoquinona (QB) pelo sítio de ligação à proteína D1 do fotossistema II. Logo o herbicida interrompe o fluxo normal dos elétrons que permite a geração do potencial de membrana e o armazenamento de energia química pelas células (BRUSSLAN & HASELKORN, 1989; VOET & VOET, 2004). A toxicidade do diuron em organismos não alvos se dá pela semelhança entre os sítios de inibição da proteína D1 do fotossistema II e do complexo bc1 presente na cadeia respiratória dos eucariotos (RAGO & COLSON, 1988).

A degradação de compostos aromáticos clorados, como é o caso do diuron, é dificultada proporcionalmente pela quantidade de halogênios presentes na molécula, os quais dificultam o acesso das enzimas às interações moleculares. (BATISSON et al., 2007). Muitos microrganismos se mostraram capazes de metabolizar parcialmente o diuron (ROQUE & MELO, 2000), entretanto a maioria dos estudos aponta a transformação do diuron em compostos possivelmente mais tóxicos (GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

A degradação do diuron pode ser iniciada pelo processo de demetilação, produzindo N-(3,4-diclorofenil)-N-metiluréia, mais conhecido como DCPMU, e em seguida N-3,4- diclorofeniluréia, ou DCPU. Outro produto formado a partir da degradação do diuron é o 3,4-dicloroanilina, ou 3,4-DCA, um dos principais metabólitos proveniente do diuron, que, quando combinado com outros compostos pode tornar-se mais recalcitrante e menos biodisponível (KEARNEY & PLIMMER, 1972; BOLLAG, MINARD, LIU, 1983).

Entretanto, mesmo que sua formação por processos químicos já tenha sido descrita (Figura 2), seu surgimento a partir de processos de biotransformação ainda gera dúvidas, pois não se sabe ao certo se o produto se origina da formação do DCPU ou se aparece diretamente da degradação do diuron (Figura 3) (TIXIER et al., 2000; DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2004; GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

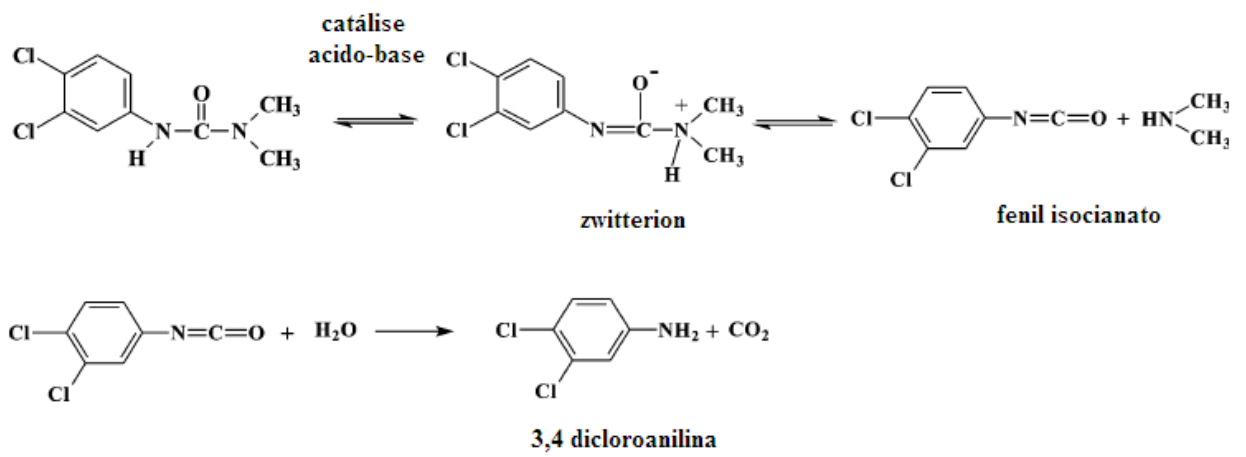


Figura 2: Degradação química do diuron (Fonte: Modificado de SALVESTRINI, DI CERBO, CAPASSO, 2002).

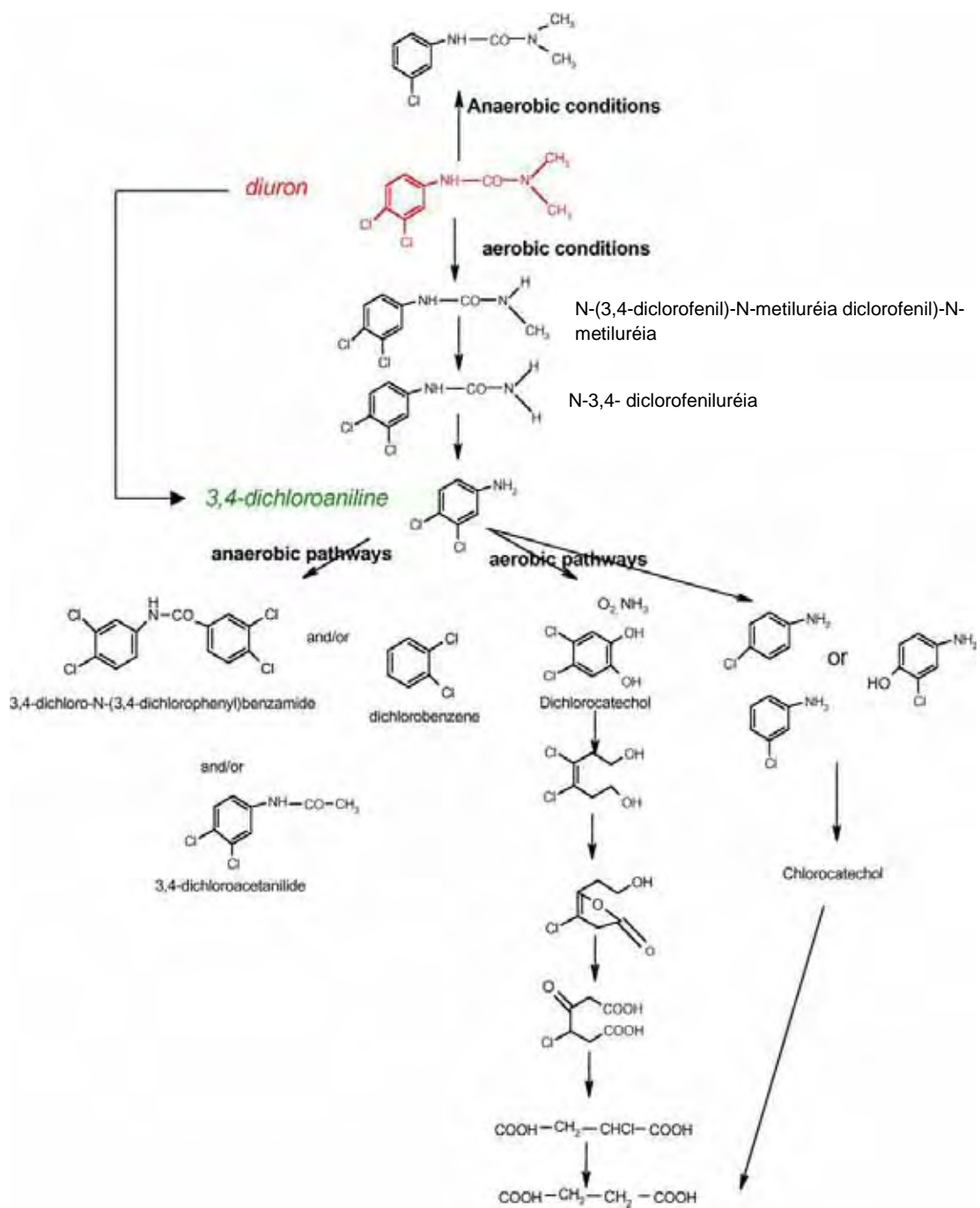


Figura 3: Vias metabólicas de degradação bacteriana de diuron e 3,4 dicloroanilina (Fonte: Modificado de GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

2.5 ENZIMAS FÚNGICAS

O uso de processos biotecnológicos vem crescendo cada vez mais no âmbito industrial, possibilitando a introdução de um grande número de metabólitos de interesse, como as enzimas (MACIEL, 2006). As enzimas são consideradas catalisadores naturais que apresentam propriedades que as tornam altamente desejáveis para aplicação em processos industriais tais como seletividade, catálise livre de liberação de produtos tóxicos, economia de água e energia e atuação em condições brandas (SCHMID et al., 2002).

A maioria das enzimas utilizadas na indústria é de caráter extracelular e de origem microbiana. Entre as comercialmente utilizadas, destacam-se as proteases (constituem 50% do mercado), celulasas e xilanasas. Processos fermentativos são utilizados para a produção desses catalisadores biológicos como a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm), sendo esta última a mais utilizada industrialmente, geralmente aplicando-se microrganismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção por FSm é alto tornando o processo, muitas vezes, economicamente inviável (PANDEY et al., 2001; PINTO et al., 2005; PAL & KHANUM, 2010). A fermentação no estado sólido é um bioprocessos que vêm sendo muito aplicado para obtenção de vários metabólitos, favorecendo a utilização dos mais diversos tipos de resíduos, dos quais podem contribuir para a economia do processo (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES, 1992; PINTO et al., 2005).

2.5.1 XILANASE

A xilana é o principal componente da hemicelulose, responsável por 30 a 35% do peso seco total do polissacarídeo, embora a abundância exata da xilana possa variar com o tipo do material vegetal (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997; KOUKIEKOLO et al., 2005). Xilanasas microbianas são os catalisadores mais utilizados para a hidrólise de xilana devido à sua alta especificidade, condições de reação leve e insignificante perda de substrato (KULKARNI, SHENDYE, RAO, 1999).

As xilanasas são β -glucanases (glicosídeos) que hidrolizam ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal. Devido à hemicelulose apresentar vários polímeros em sua estrutura, a sua degradação requer a presença de um complexo xilanólítico (BEG et al.,

2001; POLIZELI et al., 2005), constituído, em geral, de basicamente seis enzimas diferentes. As endo β -1,4 xilanases (1,4- β -D-xilano-hidrolase, EC 3.2.1.8) clivam a xilana randomicamente em suas ligações β -1,4 da hemicelulose (na cadeia principal da xilana) em pequenos fragmentos como xilotriose e xilobiose. Esta enzima forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana, liberando xilooligossacarídeos. As β -xilosidases (β -D-xilosídeo-xilohidrolase, EC 3.2.1.37) catalisam a hidrólise de xilobiose e pequenos xilooligossacarídeos em regiões não-redutoras liberando xilose (BEG et al., 2001). Esta enzima é essencial na degradação da arabinoxilana em xilose pois diminui a concentração de xilobiose, que é um inibidor das endoxilanases (SAHA, 2003).

Enzimas acessórias auxiliam a ação das endo-xilanases na remoção das ramificações da cadeia do xilano (COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005) como a α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que hidrolisa terminais não redutores de polissacarídeos contendo resíduo de L-arabio galactana; a α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), que hidrolisam resíduos laterais de ácido glicurônico; a acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72), que hidrolisam grupos acetil e ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73), que hidrolisam resíduos de ácido ferúlico (JEFFRIES, 1994). Portanto, as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -1,4 xilanase e β -xilosidase) e enzimas que degradam as ramificações (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase) (PRADE, 1995; COLLINS, GERDAY, FELLER, 2005).

A Figura 4 apresenta a estrutura da hemicelulose e os locais de atuação de cada enzima do complexo xilanolítico.

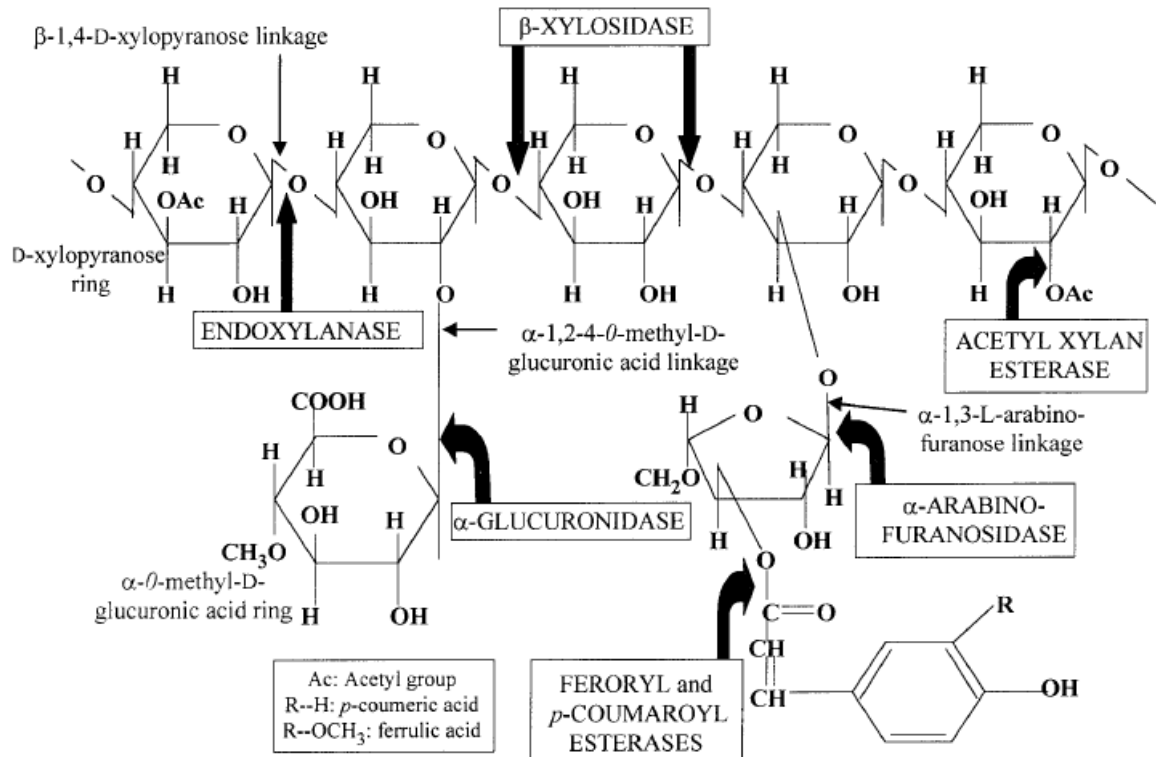


Figura 4: Degradação do polímero de hemicelulose por enzimas microbinas (Fonte: BEG et al., 2001)

As xilanases apresentam características físico químicas distintas, dependendo do microrganismo produtor (HALTRICH et al., 1996). Por exemplo, endoxilanases de bactérias apresentam pesos moleculares na faixa de 15 a 85 kDa e são mais ativas em meios levemente alcalinos ou neutros (pH 5,0-8,0) e em temperaturas mais elevadas (50-90°C) (ESTEBAN, CHORDI, VILLA, 1983; ZHENG, DU, ZHANG, 2000). Por outro lado, as xilanases fúngicas têm pesos moleculares na faixa de 7 a 60 kDa, são geralmente mais ativas em pH entre 3,5 e 6,0 e temperatura de 40-60°C (BAILEY, PULS, POUTANEN, 1991) e a degradação de um material hemicelulolítico pelos fungos ocorre necessariamente de forma extracelular, pela despolimerização do composto em compostos menores, metabolizáveis pelo microrganismo (FERRAZ, CÓRDOVA, MACHUCA, 2003).

Vários estudos já demonstraram xilanases produzidas por vários gêneros de fungos filamentosos como *Penicillium Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor*, *Talaromyces*, entre outros (RUEGEER & TAUK-TORNISIELO, 2004; KHENG & OMAR, 2005; PAL & KHANUM, 2010).

A secreção das xilanases pelos microrganismos podem ser constitutivas, ou seja, sintetizadas pelos microrganismos independentemente da sua necessidade, em

velocidade constante, ou indutivas, quando ocorrem inicialmente em pequenas quantidades e aumentam sua concentração na presença de um determinado substrato. (ANGELO, 1995).

Alguns microrganismos produzem xilanases extracelulares livres, enquanto outros produzem um complexo enzimático (MEC), em que várias enzimas, como celulases e xilanases são combinados dentro de um complexo. Esse complexo tem atraído grande atenção em tecnologia dos biocombustíveis, pois oferece uma solução para uma degradação efetiva de material vegetal complexo em açúcares fermentáveis (DYK et al., 2010).

As xilanases apresentam utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos, por isso estudos de termoestabilidade e pH ótimo destas enzimas são propriedades de importância particular (MACIEL, 2006). A aplicação das xilanases na indústria alimentícia (BIELY, 1985) visa à clarificação de sucos e vinhos e fabricação de pães (VAN DER BROECK et al., 1990). Também são utilizadas como suplemento na alimentação animal, na produção de etanol e em aplicação conjunta com outras polissacaridasas, nas vinícolas e cervejarias, para reduzir a concentração de β -glicanas, que aumentam a viscosidade do mosto, prejudicando, conseqüentemente, a etapa da filtração e dificultando a clarificação dos vinhos (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005; BAKRI, AL-JAZAIRI, AL-KAYAT, 2008).

Uma das mais importantes aplicações da xilanase está nas indústrias de celulose e papel, pois são usadas para o clareamento da polpa, substituindo a utilização do cloro e minimizando o impacto ambiental gerado por esses processos. A utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas resulta na formação de compostos residuais denominados organoclorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente (KULKARNI, SHENDYE, RAO, 1999).

2.5.2 CELULASE

A celulose é o principal polímero dos vegetais, sendo um polímero linear, formado exclusivamente por moléculas de D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (LEHNINGER, 1976). A estrutura da celulose é formada por feixes de fibras cristalinas que são geralmente muito resistentes à degradação (Figura 5). Os modelos atuais de organização microfibrilar sugerem que a celulose tenha uma

subestrutura constituída por domínios altamente cristalizados, unidos por ligações amorfas (CAVALCANTI, 2005).

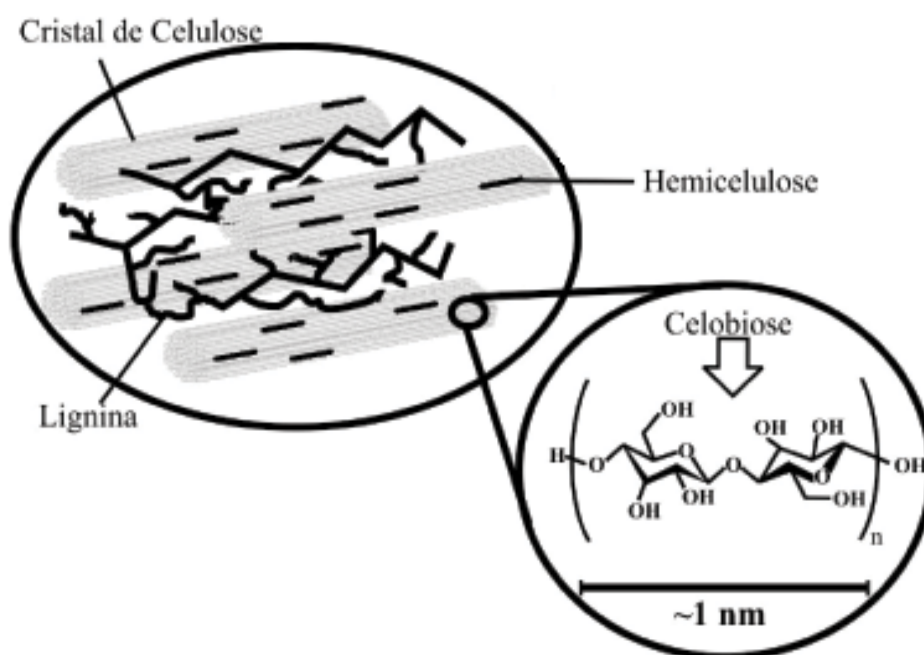


Figura 5: Composição da fibra vegetal (Fonte: SILVA, GROSSMAN, DURRANT, 2009).

A hidrólise dessa estrutura pode ser feita por meio de tratamentos ácidos, básicos ou por ação de enzimas celulolíticas produzidas por microrganismos (MARCONDES et al., 1983) e outros tipos de organismos como térmitas (cupins), sendo esses organismos possuidores de uma série de diferentes celulasas (endoglucanases e celobiohidrolases) que quebram as ligações glicosídicas (HOWARD & ELLIOTTI, 1988).

O termo celulase compreende o grupo de enzimas envolvidas na degradação completa das fibras da celulose, ou seja, até a liberação de monômeros estruturais, como a glicose. Todos os organismos que degradam a celulose secretam sistemas complexos de celulasas, compostos por variedades de enzimas com especificidade e modo de ação distintos, as quais agem em sinergia hidrolisando a celulose (BÉGUIN, 1990). As enzimas conhecidas como celulasas hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos e a classificação das hidrolases *O*-glicosídicas (EC 3.2.1.-) é feita com base na sua especificidade ao substrato e no seu mecanismo molecular (WOLFF, 2002).

As celulasas são descritas como um grupo complexo de quatro enzimas principais. As endoglucanases (EC 3.2.1.4), responsáveis por clivar ligações glicosídicas internas; as β -1,4-celobiohidrolases ou exoglucanases (EC 3.2.1.91), que clivam unidades de celobiose das extremidades das cadeias de celulose; as

celobiohidrolases e as endoclucanases que atuam sinergisticamente para a degradação completa da celulose cristalina; as β -glicosidades ou celobiasas (EC 3.2.1.21), que clivam unidades de glicose a partir de celooligosacarídeos e as exoglicosídases (EC 3.2.1.74), que hidrolisam consecutivamente a remoção de unidades de glicose de terminais não redutores de celodextrinas (SCHULEIN, 2000; PALJEVAC et al., 2007).

As celulasas são enzimas multifuncionais que apresentam diferentes especificidades (exo e endohidrolases), sendo sua atividade conseqüência de detalhes na estrutura tridimensional da proteína (GILKES et al., 1991).

A maioria dos estudos envolvendo degradação de celulose foi feita com fungos degradadores de madeira, ou seja, agentes de podridão mole como *Rhizopus* sp, *Rhizoctonia* sp, *Fusarium* sp e *Verticillium* sp. Uma grande variedade de microrganismos produzem celulasas, entretando somente alguns capazes de degradar a celulose natural (RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004). Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exoglicosídases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

A produção de celulase é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolizáveis (efeito *feed-back* negativo) e em diversos sistemas a síntese de celulase é regulada por celobiose ou sofrose, que são geradas a partir da degradação da celulose por pequenas quantidades de celulase constitutiva (BÉGUIN, 1990).

A aplicação das celulasas na indústria é bastante ampla, sendo utilizada amplamente no setor alimentício (extração do amido da batata doce, produção do vinagre de laranja clarificação de sucos de frutas cítricas) (BHAT, 2000) como também no setor de biocombustíveis (bioetanol) (MAICHE & HUBER, 2010).

2.5.3 LACASE

A lignina é um polímero insolúvel, rígido, de peso molecular elevado e ligações cruzadas. Atua como suporte nas paredes da célula, e possui estrutura química bastante distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura aromática. É formada basicamente por três alcoóis (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) e possui ligações éter (C-O-C) e/ou carbono-carbono (C-C) (AMEN-CHEN, PAKDEL, ROY, 2001). A

lignina é degradada na natureza por fungos de podridão branca, na sua maioria basidiomicetos e alguns ascomicetos. Estes microrganismos produzem um complexo enzimático com a presença das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, do qual o sucesso da degradação depende de suas ações sinérgicas (TUOMELA et al., 2000).

As lacases (p-difenil: oxigênio oxidorreduases, EC 1.10.3.2) são proteínas globulares, compreendendo subunidades de 45 à 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma e possuem entre 10-25% de carboidrato N-ligado, podendo ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas (KAHRAMAN & GURDAL, 2002). São geralmente codificadas por uma família de genes e a expressão destes pode ser constitutiva ou indutiva. Até recentemente, as lacases só foram encontradas em eucariotos (fungos, plantas superiores e insetos), mas agora há fortes indícios para a sua ampla distribuição em procariotos e a primeira estrutura cristalina de um lacase bacteriana já está disponível (CLAUS, 2004).

Filogeneticamente, as lacases são membros da família de proteínas multicobres, que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. Essas enzimas possuem 4 átomos de cobre (multicobre oxidases) distribuídos em 3 domínios de seu sítio ativo (T1, T2 e T3). O cobre do sítio T1 é o responsável pela absorção da enzima na faixa dos 600 nm, conferindo a coloração azul, típica de proteínas multicobres (DURÁN & ESPOSITO, 2000; BALDRIAN, 2006). Devido ao seu alto potencial redox, o cobre I é o sítio onde ocorre a oxidação do substrato e os sítios de cobre II e III formam um centro trinuclear onde ocorre a redução de O₂ e liberação de H₂O. (ENGUITA et al., 2003; CLAUS, 2004; BALDRIAN, 2006). No ciclo catalítico de lacase (Figura 6) ocorrem quatro oxidações monoelétrônicas do substrato catalisado pelo cobre I. Os elétrons são transferidos ao agrupamento trinuclear, onde ocorre redução de oxigênio molecular e liberação de H₂O. A oxidação do substrato gera radicais reativos que podem sofrer reações não-enzimáticas (MOUGIN et al., 2003; TORRES, BUSTOS-JAIMES, BORGNE, 2003).

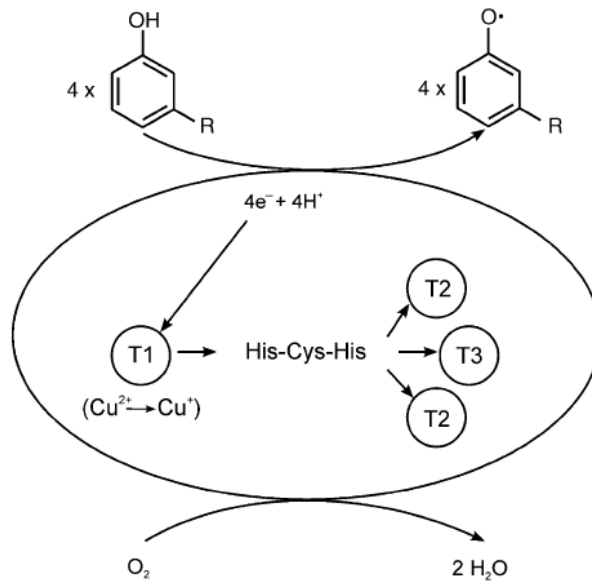


Figura 6: Ciclo catalítico das lacases evidenciando sua atuação direta sobre substratos fenólicos (BALDRIAN, 2006).

As oxidações realizadas pelas lacases podem ocorrer por interação enzima-substrato (compostos fenólicos) e por reações em presença de uma molécula mediadora (substratos não fenólicos), as quais ampliam significativamente a gama de substratos das lacases (LEONOWICZ et al., 1999).

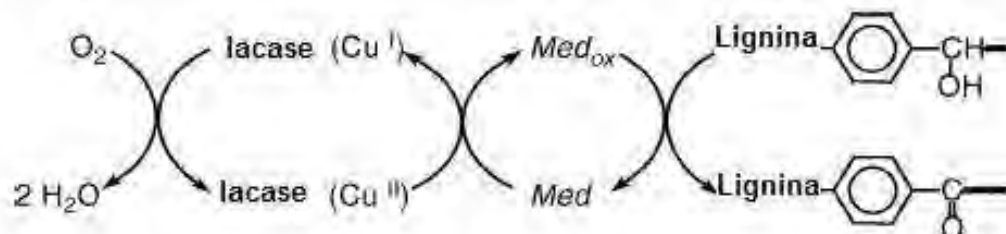


Figura 7: Mecanismo de reação lacase-med (BRANCHI, GALLI, GENTILI, 2005).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, e sua alta capacidade de oxidação não-específica, as lacases são biocatalisadores úteis para diversas aplicações biotecnológicas como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (DURÁN et al., 2002; MAYER & STAPLES, 2002).

A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH,

temperatura, taxa de aeração, etc (KAHRAMAN & GURDAL, 2002) e suas propriedades bioquímicas e físico-químicas fornecem muitas informações importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUGIN et al., 2003). Fungos degradadores de lignina podem expressar diferentes genes de lacase, ou seja, enzimas semelhantes em sua estrutura, entretanto com diferentes características físico-químicas (BROWN, ZHAO, MAUK, 2002). A especificidade da enzima ao substrato oxidado depende da sua origem, portanto, lacases de diferentes fungos oxidam diversos substratos (RINGLING & VAN ALFEN, 1993). Logo, muitos estudos são necessários para melhor compreender sua importância fisiológica e sua utilização em processos biotecnológicos (KANG et al., 2002; CLAUS, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o perfil de produção enzimática e potencial de degradação do herbicida diuron pelos fungos isolados de solo de plantação de cana-de-açúcar.

3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar o perfil de fungos isolados de uma plantação de cana-de-açúcar em solo que ocorre corte manual (após queimada) e corte por máquinas (solo de palha) em diferentes fases do plantio da cana.
- Comparar e avaliar a produção de celulase, xilanase e lacase entre os isolados, em meio contendo substratos de origem agroindustriais por meio de fermentação em estado sólido.
- Estimar, por meio de cultivo dos fungos em presença de diuron e análises cromatográficas, as taxas de degradação do princípio ativo do herbicida pelos diferentes gêneros isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIO DE CULTURA

4.1.1 MEIO LÍQUIDO PARA ISOLAMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS

O meio nutriente utilizado foi descrito por Kirk et al., (1978) com algumas modificações, em pH 5,0, contendo 0,5% de glicose ou 5 g de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, 0,14% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2% de KH_2PO_4 , 0,03% de CaCl_2 , 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4% de peptona, 0,1% de Tween 80 e 0,5% de solução de elementos traços (2,2% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1% de H_3BO_3 ; 0,5% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16% de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11% de $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5% de EDTA).

As fontes de carbono utilizadas foram glicose, farelo de trigo lavado, bagaço de cana lavado e triturado e papel de filtro lavado e picado (10x10mm). Optou-se pela variação dos substratos devido as diferentes respostas dos fungos perante cada fonte de carbono, fato observado por Pinto et al. (2005) e Silva Jr. & Pereira (2007), entre outros.

Foi, ainda, adicionada ao meio uma solução de antibiótico de concentração 0,1g/mL, contendo ampicilina e cloranfenicol na proporção 1:1.

4.1.2 MEIO SÓLIDO PARA ISOLAMENTO DAS CULTURAS

Utilizou-se o meio nutriente descrito no item 4.1.1, acrescentando 2% de Agar, para o repique dos fungos, na obtenção das culturas puras.

4.1.3 ARMAZENAMENTO DA COLEÇÃO

O meio Agar Saboraud Dextrose (10 g/L de peptona, 40 g/L de dextrose e 15 g/L de Agar; pH 5,6 a 25°C) foi preparado segundo as instruções do fabricante (Himedia Laboratórios PVT, LTD) e vertido em tubos de ensaio e placas de petri descartáveis para armazenamento das colônias. Este meio possui a composição de

4.2 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETAS

As coletas foram realizadas nas propriedades de plantio da Usina Açucareira Virgolino de Oliveira S/A ([Unidade José Bonifácio](#)), situada na cidade de José Bonifácio-SP, em dois diferentes tipos de solos: solo que ocorre queimada para corte da cana e solo que não ocorre a queimada.

Para ambas as áreas, a taxa de pluviosidade, temperatura e umidade são as mesmas (Tabela 4) e a localização das áreas de coleta e suas características apresentam-se na Tabela 5. Todos os dados cadastrais das áreas de isolamento foram fornecidos pelo Departamento de Agronomia da Usina Açucareira Virgolino de Oliveira S/A.

Tabela 4: Características da área ao longo do período de coleta.

MÊS/2009	PLUVIOSIDADE	TEMPERATURA	UMIDADE
Abril	179,6 mm	22,93 °C	72,8%
Mai	37 mm	21,2 °C	69,5%
Junho	87,8 mm	17,66 °C	36,8%
Julho	53,4 mm	19,67 °C	34,7%
Agosto	132 mm	20,3°C	55,3%
Setembro	323 mm	23,5°C	74%
Outubro	117,8 mm	23,8°C	73,7%
Novembro	176,4 mm	26,1	74,5%

Tabela 5: Características das áreas de coletas.

	ÁREA 1: SOLO DE QUEIMADA	ÁREA 2: SOLO DE PALHA (SEM QUEIMADA)
SOLO	<ul style="list-style-type: none"> • Primeiro Plantio de cana-de-açúcar na área. • Cana de ano e meio. • Variedade: SP86-42. • Primeira coleta realizada após 3° corte da cana. • Cultura anterior: gramínea (pastagem). • Produtividade 71.74 T/há. • Aeração causada pelo cultivador, Sem corretivos, somente adubo (500Kg 17-06-20 / ha). • Aplicação de vinhaça: 180m³/há. • Herbicida: Velpar (Diuron + Hexazinona), Ametrina (Triazina) e Msma (Arsenical). 	<ul style="list-style-type: none"> • Primeiro Plantio de cana-de-açúcar na área. • Cana de ano e meio. • Variedade: RB85-5453. • Primeira coleta realizada após 2° corte da cana. • Cultura anterior: gramínea (pastagem). • Produtividade 85,17 T/ha. • Aeração causada pelo cultivador, sem corretivos, somente adubo (500Kg 7-06-20 / ha). • Herbicida: Velpar (Diuron + Hexazinona), Ametrina (Triazina) e Msma (Arsenical).
LOCALIZAÇÃO	<ul style="list-style-type: none"> • Área 1 – FA 30654 • Latitude - 610916 • Longitude - 7662950 	<ul style="list-style-type: none"> • Área 2 – FA 30371 • Latitude - 608017 • Longitude – 7682654
CARTA DE SOLO	<ul style="list-style-type: none"> • Terreno Fortemente Ondulado, Boa Parte Margeado por um Rio. • Aproximadamente 50% da área, GXd3.1 GLEISSOLO HÁPICO Distrófico, textura média 2. • 25% da área LVd3.3, LATOSSOLO VERMELHO Distrófico, textura média 2 ou média 1 ou média 2/argilosa, argilúvico, SB<1. • E 25% da área LVA3.4, LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, textura média 2 ou média2/média1, SB<1. • AMBIENTE DE PRODUÇÃO EDAFOCлимATICO • Aproximadamente 47% da área D-III, médio-baixo, • E 50% da área C-III, médio • E 3% da área F-III 	<ul style="list-style-type: none"> • Terreno totalmente plano, menos de 1% de declividade. • Aproximadamente 32% da área LVAd3.4, LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, textura média 2 ou média2/média1, SB<1. • 68% da área LVd3.3, LATOSSOLO VERMELHO Distrófico, textura média 2 ou média 1 ou média 2/argilosa, argilúvico, SB<1. • AMBIENTE DE PRODUÇÃO EDAFOCлимATICO. • Aproximadamente 81% da área D-III, médio-baixo, • E 19% da área C-III, médio.

4.3 COLETAS – LOCAIS E PERÍODOS

O isolamento foi realizado por coletas de amostras em solo de plantio de cana-de-açúcar, durante a safra, como mostra a Tabela 6. A Figura 8 mostra as áreas coletadas em cada época do cultivo da cana.

Tabela 6. Cronograma de coleta.

Coleta	Etapa	Data
1ª	Solo após corte da última safra (sem correção ou aplicação de herbicidas).	Setembro/2008
2ª	Solo após correção e aplicação de herbicidas.	Novembro/2008
3ª	Solo com cana de aproximadamente 2 metros de altura.	Abril/2009
4ª	Solo após corte da cana.	Setembro/2009

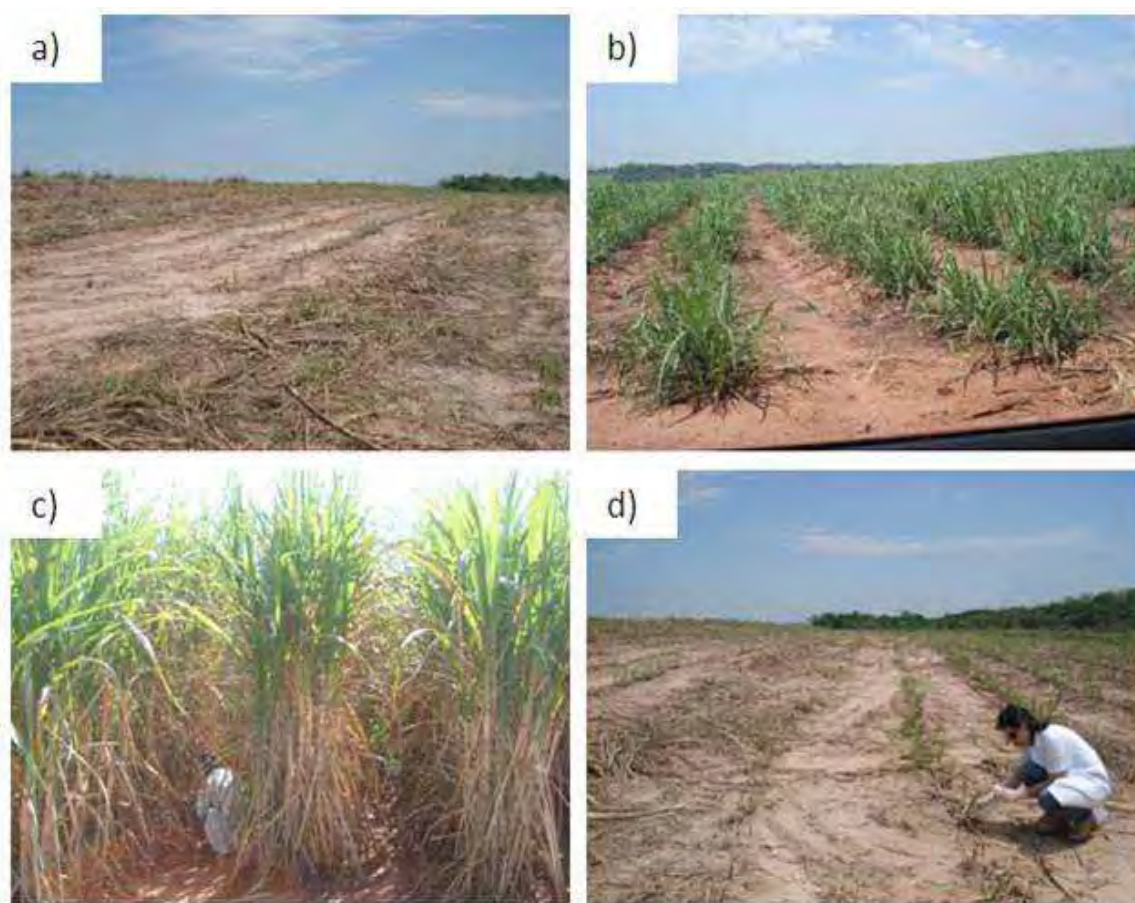


Figura 8: Diferentes épocas do cultivo da cana-de-açúcar: a = Solo sem correção; b = Solo pós correção; c = Solo antes do corte; d = Solo pós corte.

Foram transferidos porções de solos de 3 locais diferentes (bordas e centro – Figura 9) para frascos contendo 20 mL do meio nutriente descrito (4.1.1), previamente esterilizado. Para cada área foi utilizado um frasco de cada substrato.

No laboratório, os fracos (Figura 10) foram incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 72 horas e, após transcorrido o tempo de incubação, as amostras foram transferidas, por meio de estrias, para placas de Petri contendo meio sólido (4.1.2). Após surgimento das colônias, as mesmas foram separadas com base no aspecto do micélio, cor de esporos e em outras características do reverso das colônias, sendo reinoculadas até obtenção das culturas puras, em meio Agar Saboraud Dextrose.

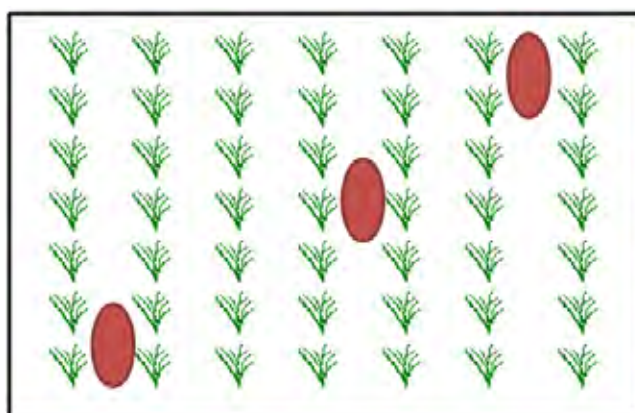


Figura 9: Locais de coleta na área de isolamento



Figura 10: Frasco de coleta.

Depois de realizado o isolamento, os fungos foram codificados segundo respectivo meio do qual foi coletado. Assim, os fungos com código G foram isolados em meio contendo glicose, F contendo farelo de trigo, B contendo bagaço de cana e P contendo papel de filtro.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a identificação dos fungos, os isolados foram cultivados em Agar Malte 2% e Agar Saboraud Dextrose (GAMS, HOEKSTRA, APTRoot, 1998) durante 7 dias, a 28° C. Após esse período, características macro (coloração, aspecto do micélio e reverso da colônia) e microscópicas (e produção de esporos, hifas e corpo de frutificação) foram analisadas e catalogadas em fichas de identificação (APÊNDICE 1) para armazenamento de suas características morfológicas e origem do isolamento.

No caso da observação microscópica, preparações a fresco foram realizadas utilizando-se água ou KOH - 3M como líquido de montagem, dependendo do isolado. Chaves de identificação consideradas clássicas na literatura como Samson et al. (2000) Barron (1986), Domsch et al. (1980) e Gams, et al. (1998) foram utilizadas para separar os isolados em gênero e espécie.

4.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O pré-inóculo para a fermentação sólida foi feito em erlenmeyer de 250 mL, contendo 60 mL de meio modificado de Kirk et al. (1978) como descrito no item 4.1.2. Após 120 horas de incubação a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, acrescentou-se 200 mL de solução salina para obtenção da suspensão micelial do fungo (Figura 11). A solução salina é composta por 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,35% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de CaCl_2 em pH 5,0.

Os cultivos em meio sólido foram realizados em sacos de propileno, contendo 5g de mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1), sendo fechados com tubo PVC e vedados com rolha de algodão (Figura 12). Os sacos foram inoculados com 20 mL de suspensão micelial e incubados em BOD a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os sacos permaneceram incubados por 240 horas, sendo retirado 1 a cada 48 horas, gerando um total de 5 sacos por isolado.



Figura 11: Esquema de fermentação em estado sólido e extração de enzima.



Figura 12: Sacos utilizados na fermentação em estado sólido.

Para a extração das enzimas, foram adicionados 100 mL de água destilada ao material fermentado. Em seguida os sacos foram homogeneizados por agitação em shaker, a 50 rpm, por 30 minutos, filtrados e centrifugados a 10000 rcf durante 15 minutos, a 5°C. O sobrenadante foi utilizado como solução bruta.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.6.1 XILANASE E CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)

As atividades de xilanase e carboximetilcelulase (CMCase) foram determinadas em uma mistura reacional contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução tampão (1,0% em solução tampão acetato, 0,1M e pH 5,0 para xilanase e 2,0% em solução tampão acetato, 0,1M e pH 5,0 para CMCase). A mistura de reação foi mantida em 40°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1,3-dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade necessária para liberar 1,0 μmol de açúcar redutor, por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4.6.2 LACASE

A atividade de lacase foi determinada utilizando metodologia descrita por Buswell et al. (1995), baseada na oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'-azino-bis-etilbentiazolina). A reação foi mensurada a 420 nm, após incubação de 1 minuto a 40°C, com 0,9 ml de tampão acetato de sódio (100mM e pH 3,5), 0,03% de ABTS e 0,1 ml da solução enzimática.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de ABTS, por minuto, considerando ϵ para o ABTS oxidado de $3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7 HERBICIDA DIURON

Os ensaios de degradação de herbicida foram realizados com o produto comercial do diuron, Karmex® (Du Pont), do qual apresenta-se em formulação de grânulos dispersáveis em água contendo 80,0% (m/m) de princípio ativo 3-(3,4-

diclorofenil)-1,1-dimetiluréia. Para as análises em HPLC foram utilizados padrões analíticos Aldrich Chemistry (diuron, 99% de pureza).

4.8 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O pré-inóculo utilizado na fermentação submersa foi feito raspando-se a superfície da cultura em placa de petri e transferindo os fragmentos de micélio para o meio descrito anteriormente (4.1.1), porém sem a presença de tween 80. Após 5 dias de cultivo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, o pré-inóculo foi lavado com tampão de Knapp, pH 6,5 (TIXIER et al., 2000) e triturado. A composição do tampão de Knapp é dada por 1% de KH_2PO_4 , 1% de K_2HPO_4 , 0,004% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL de meio descrito (4.1.1), acrescido de solução de 10mg/L de herbicida e 0,05% de extrato de levedura e 0,05% de glicose, em pH 5,0. A adição de extrato de levedura ao meio de cultivo foi realizada para garantir maior nutrição ao isolado e garantir maior crescimento do fungo, fato observado por Kodama et al. (2001). Cada erlenmeyer foi inoculado com 1 mL da suspensão de micélio triturado e incubado a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 13). Amostras foram retiradas no intervalo de 24 horas e, decorrido o tempo de cultivo, os fermentados foram filtrados a vácuo em papel de filtro Whatman nº1 e centrifugados por 10 minutos a 10000 g, a 5°C . O sobrenadante foi utilizado para avaliação do potencial de degradação do herbicida diuron pelos fungos selecionados.



Figura 13: Fermentação submersa.

4.9 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA EM HPLC

A degradação do herbicida foi avaliada em HPLC acoplado a um detector coulométrico eletroquímico (Coulchem III ESA, Bedford, MA). Antes de injetadas, as amostras foram filtradas em filtros Millex em polietileno de 0,22 μ m de poro, 13 mm, não estéril. As condições da análise em HPLC foram: 60 μ L de volume injetado de amostra; Coluna PerkinElmer C18 (Coluna Brownlee Analytical C18 – 250 mm x 4.6 mm x 5 μ m); Tempo de corrida de 10 minutos; Eluição Isocrática contendo como fase móvel acetonitrila e água (60/40 v/v); Fluxo de 1 mL/min; Detector UV ajustado a 240nm e Forno a 40°C.

Para a obtenção da concentração exata de diuron no meio, comparou-se os valores obtidos com a curva padrão. Preparou-se soluções de concentração 1, 5, 10, 15 e 20 mg/L do padrão analítico de diuron (Aldrich Chemistry) e em seguida foram analisados em HPLC, nas mesmas condições das amostras.

O controle da fermentação foi feito como descrito para a fermentação submersa, porém considerando 1 mL de água destilada autoclavada como inóculo. O controle permitiu verificar a degradação espontânea do herbicida durante o tempo da fermentação como também a conservação da concentração do mesmo no meio.

Alíquotas de tempo zero foram retiradas para comparação da taxa de degradação e verificação do perfil do cromatograma gerado na ausência de qualquer produto de degradação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Foram coletados 32 frascos, resultando num total de 75 fungos isolados proveniente das duas áreas de coleta (solo de queima e solo de palha). Isolou-se em média, 2,34 fungos por frasco, sendo o surgimento mínimo de 1 e máximo de 4 gêneros diferentes. Fungos de mesmo gênero, porém isolados em época, solo e meios diferentes foram considerados cepas distintas, caracterizando num total de 75 isolados.

A distribuição detalhada dos fungos isolados neste trabalho encontra-se na Tabela 1 do Apêndice 2. A identificação dos isolados foi feita em nível de gêneros (APÊNDICE 1B), sendo que para alguns, foi possível a identificação da espécie.

A porcentagem de cada gênero isolado encontra-se esquematizado na Figura 14:

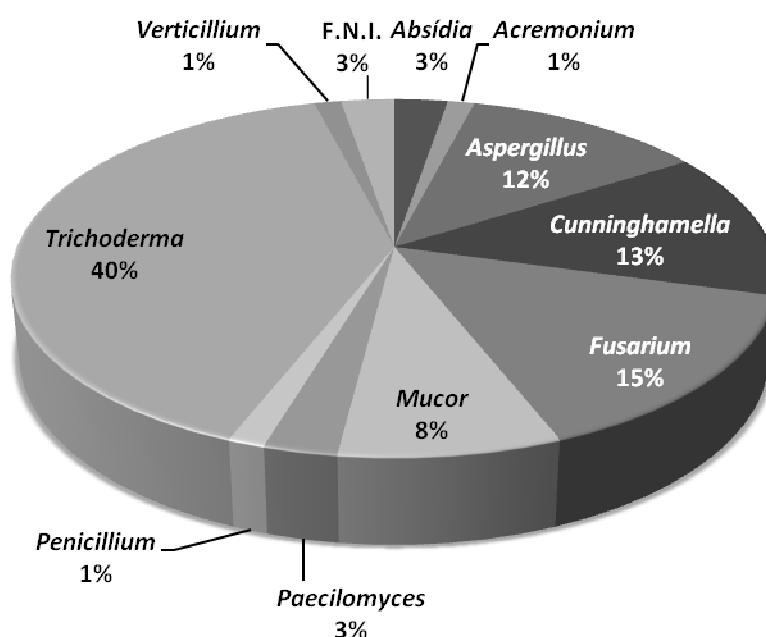


Figura 14: Distribuição dos isolados por gênero.

De acordo com a literatura, os gêneros encontrados neste isolamento são representativos de fungos presentes em solos, conforme também observado por Bordjiba et al. (2001), Colla et al. (2008), Silva et al. (2009), entre outros. Dentre os

fungos isolados, a maioria foi referente ao gênero *Trichoderma* (40%), seguido de *Fusarium* (15%), *Cunninghamella* (13%) e *Aspergillus* (12%).

Esses dados se assemelham aos encontrados por Potin et al. (2004) que isolaram 21 fungos de solos contaminados por hidrocarbonetos poli-aromáticos (HPAs) e encontraram 28,6% de *Trichoderma*, 23,8% de *Fusarium* e 4,8% de *Mucor*, entre outros, em menores proporções. Entretanto, os resultados se diferenciam daqueles obtidos por Colla et al. (2008), que isolaram na maioria o *Penicillium* (53,3%) e *Aspergillus* (26,6%) e menor proporção de *Trichoderma* (20%) de solo contaminado por herbicidas triazínicos. Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) isolaram 81 fungos, sendo 43,9% *Penicillium*, 21,95% *Trichodema*, 3,66% *Aspergillus* e *Paecilomyces*, entre outros, de solo de estação ecológica.

A diferença entre os isolados encontrados de um solo para outro reforça as observações de Ritz & Young (2004) sobre a interferência das variações das características do solo, como porosidade, quantidade de água e a distribuição de nutrientes, no desenvolvimento e atividade dos fungos. Os fungos têm alterado os caminhos energéticos de seus próprios ambientes de acordo com o fornecido pelo meio, se expandindo em um curto período de tempo e regulando seu habitat. Estes conceitos fornecem novos aspectos sobre o solo e a sua interação entre a estrutura e a biota proporcionando mais conhecimento sobre o funcionamento do ecossistema local (RITZ & YOUNG, 2004).

5.2 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS ESPÉCIMES

5.2.1 DISTRIBUIÇÃO POR ÁREA DE COLETA

A escolha de isolar fungos a partir solos com diferentes processos de corte da cana-de-açúcar foi feita com o propósito de verificar a interferência da ação da queimada na comunidade microbiana local. A quantidade de isolados de cada gênero em ambos locais encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7: Gêneros dos isolados (por área de coleta).

Gênero	Solo queimada	Solo palha (não queimada)
<i>Absidia</i>	-	2
<i>Acremonium</i>	-	1
<i>Aspergillus</i>	7	2
<i>Cunninghamella</i>	6	4
<i>Fusarium</i>	7	4
<i>Mucor</i>	3	3
<i>Paecilomyces</i>	2	-
<i>Penicillium</i>	1	-
<i>Trichoderma</i>	14	16
<i>Verticillium</i>	1	-
F.N.I.*	1	1
TOTAL	42	33

*Fungo não identificado.

Dentre o total de fungos isolados em cada área, foram encontrados 56% na área de queimada e 44% na área de palha (não queimada). A diversidade de gêneros encontrada em ambas as áreas não apresentou diferença significativa, sendo encontrados 9 gêneros no solo com queima e 8 no solo de palha (não queimada), entretanto a mesma observação não foi feita quanto a similaridade de gêneros.

Para expressar a similaridade na composição dos gêneros encontrados em ambas as áreas de coleta, aplicou-se o índice de similaridade de Sorensen. De acordo com a Equação 1, tem-se que a similaridade dos gêneros encontrados em ambas as áreas é de 0,58, lembrando que quanto mais próximo de 1, mais as comunidades são semelhantes.

Equação 1: Índice de Sorensen.

Fórmula Geral:

$$S = \frac{2 (S12)}{(S1+S2)}$$

S1 = número de gêneros encontrados na área 1

S2 = número de gêneros encontrados na área 2

S12 = número de gêneros comuns às duas áreas

Aplicação do Índice:

$$S = \frac{2 (5)}{(9+8)} = \frac{10}{17} = 0,58$$

O índice sugere uma variação expressiva da diversidade de gêneros encontrados em ambas as áreas, mostrando que, apesar da diferença na quantidade de fungos isolados ser de 12%, a diversidade entre as áreas é bem mais significativa.

O método utilizado para estudar a diversidade de fungos dos solos no presente trabalho permitiu recuperar gêneros de crescimento mais rápido, não sendo o caso aqui avaliar toda a população fúngica presente. Os dados das coletas podem ter tornado o método insensível a mudanças rápidas nas comunidades microbianas, fornecendo condições de avaliar apenas uma porção da comunidade total de microrganismos do solo (SILVEIRA & FREITAS, 2007). Assim, existe uma parcela da diversidade local que possivelmente não foi amostrada pelo método e que poderia ser caso fosse utilizado outras metodologias, tais como, diluição seriada e métodos independentes de cultivo.

Deve ser reforçado que o objetivo do trabalho foi obter uma amostragem das populações fúngicas em plena atividade no momento das coletas, tentando correlacionar esses isolados com as condições do solo (queimada ou não) e frente a adição de herbicidas.

Outro resultado relevante entre as duas áreas está no número de fungos isolados. Este resultado responde diferentemente ao observado por Mendonza et al. (2000) que demonstraram que a biomassa microbiana de solo sem sistema de queima apresenta valores mais elevados quando comparado ao solo que ocorre a queimada. Souza et al. (2005) e Luca et al. (2008) observaram que em solo que não ocorre a queima, a decomposição da palha aumenta o teor e o estoque de matéria no solo, que passam a funcionar como dreno de C e N atmosféricos, proporcionando um solo mais propício para a existência de biomassa em abundância.

Entretanto, Souza et al. (2005) observaram também que o uso de máquinas em solo de palha para a realização da colheita causou aumento na densidade do solo, ou seja, provocou a compactação superficial do solo até a profundidade de 40 cm. O solo impactado apresenta uma fertilidade mais baixa devido à alteração de disposição de oxigênio e solubilidade dos nutrientes no local. Em decorrência disto há um impacto no agrossistema, pois a microbiota sofre uma série de alterações como supressão de espécies sensíveis, predominância das espécies mais resistentes e tolerantes e inibição da sua atividade (MESQUITA, 2005). Em outras palavras, a diminuição da população microbiana na camada subsuperficial do solo, em determinados sistemas, pode ser explicada, principalmente, pelas piores condições para o desenvolvimento dos

microrganismos, como, por exemplo, menor aeração do solo e menor disponibilidade de matéria orgânica facilmente decomponível (LUIZÃO et al., 1991).

Sabe-se que a prática da queima tradicional do campo nativo pode causar inibição da biomassa microbiana e trazer problemas graves ao ecossistema. Por outro lado, pode haver uma adaptação da microbiota e novos produtos podem ser gerados pelas plantas, principalmente pelas raízes (SAUERBECK et al., 1982), e a biomassa reaparecer logo nos primeiros meses que seguem à queima. Assim, a queima tradicional pode proporcionar um estresse no sistema do solo, estimular as populações de microrganismos de crescimento rápido e interromper bruscamente a sucessão de ecossistemas por ciclos naturais, gerando uma biomassa microbiana qualitativamente alterada e imatura.

Logo, por estas observações, pode-se entender que o elevado número de isolados em solo de queima pode ser decorrente da reestruturação microbiana do local, sendo a predominância de fungos de crescimento mais rápido e tolerantes à mudanças extremas no meio.

5.2.2 DISTRIBUIÇÃO POR COLETA

Os gêneros encontrados em cada coleta estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Gêneros dos isolados (por coleta).

Gênero	Coleta 1 (Solo pós corte)	Coleta 2 (Solo pós correção)	Coleta 3 (Solo de cana alta)	Coleta 4 (Solo pós corte)
<i>Absidia</i>	-	1	-	1
<i>Acremonium</i>	-	-	-	1
<i>Aspergillus</i>	-	4	3	2
<i>Cunninghamella</i>	1	6	3	-
<i>Fusarium</i>	4	2	1	4
<i>Mucor</i>	1	-	1	4
<i>Paecilomyces</i>	-	2	-	-
<i>Penicillium</i>	-	1	-	-
<i>Trichoderma</i>	9	8	9	4
<i>Verticillium</i>	-	1	-	-
F.N.I.*			1	1
TOTAL	15	25	18	17

*Fungo não identificado.

Neste trabalho, pode-se observar que os gêneros *Cunninghamella*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma* foram os mais constantes nas coletas, porém somente *Trichoderma* e *Fusarium* foram presentes em todas. A abundância de algumas espécies de microrganismos parece não ser tão importante quanto à manutenção da diversidade, isso porque a abundância reflete na forma mais imediata à população microbiana de curto prazo e a diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais do solo (LAVELLE, 2000).

Pode-se observar também que na coleta 2 (solo pós correção) obteve-se a maior variedade de gêneros, podendo-se inferir que os gêneros foram selecionados pela mudança na composição do solo devido à correção e/ou por responderem à presença do herbicida no meio, resultando em uma possível metabolização do herbicida aplicado no solo ou uma restrição dos fungos predominantes anteriormente ao composto xenobiótico, dos quais poderiam ser sensíveis ao herbicida.

Assim, com frequência, os estudos não conseguem detectar relações entre a diversidade de microrganismos e os parâmetros ambientais. A redução de um ou uns poucos grupos de espécies, pode ser compensada pelo crescimento de outros, resultando na alteração dos processos ocorridos no solo (NANNIPIERI et al., 2003). Exemplo deste tipo de resposta ocorre com o glifosato, o qual, mesmo inibindo o crescimento de alguns fungos, pode incrementar, em altas concentrações, a biomassa (STRATTON & STEWART, 1992; WARDLE & PARKINSON, 1991) ou a atividade microbiana do solo (HANEY et al., 2000; BUSSE et al., 2001) como resultado da ativa mineralização do C e do N por bactérias que utilizam o herbicida como fontes de carbono e energia.

Cabe destacar ainda que, para o presente trabalho, o gênero *Penicillium*, usualmente descrito como um dos principais fungos de solo (TANAKA, MAEDA, PLAZAS, 2001; SILVEIRA & FREITAS, 2007) somente foi isolado na coleta após aplicação do herbicida. Este gênero é descrito na literatura como sendo um gênero com potencial na degradação de xenobióticos (SILVA & MONTEIRO, 2000; PEREIRA, LEMOS, DOS SANTOS, 2004; MARTINEZ, SILVA, FAY, 2008), podendo, assim, inferir sua aparição na coleta após a aplicação do herbicida.

5.2.3 DISTRIBUIÇÃO POR FONTE DE CARBONO USADO NO MEIO DE ISOLAMENTO

Os gêneros isolados em cada substrato estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Distribuição dos isolados por fonte de carbono usado no meio de isolamento.

Gênero	Glicose	Farelo	Bagaco	Papel
<i>Absidia</i>	-	1	-	1
<i>Acremonium</i>	-	-	-	1
<i>Aspergillus</i>	2	2	4	1
<i>Cunninghamella</i>	3	2	3	2
<i>Fusarium</i>	3	4	3	1
<i>Mucor</i>	2	-	2	2
<i>Paecilomyces</i>	-	1	-	1
<i>Penicillium</i>	-	1	-	-
<i>Trichoderma</i>	10	8	7	5
<i>Verticillium</i>	-	1	-	-
F.N.I.*	1	-	-	1
TOTAL	21	20	19	15

*Fungo não identificado.

Os gêneros *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Fusarium* e *Trichoderma* foram isolados em todos os meios. Os meios farelo de trigo e papel de filtro mostraram-se como melhores fontes para o isolamento dos diversos gêneros, entretanto a glicose mostrou-se a fonte de carbono a qual isolou maior quantidade de fungos. Em ambos ocorreu o aparecimento de 8 gêneros diferentes. Esses resultados indicam que ambas as fontes de carbono são utilizadas pelos fungos, provavelmente por conterem celulose em forma mais acessível, considerando que em solos agrícolas a presença de fungos celulolíticos é bastante abundante, haja vista a quantidade de resíduos lignocelulolíticos depositados constantemente.

Pinto et al. (2005) verificaram a relação entre atividade enzimática de vários fungos em diferentes substrato e constatou que o farelo de trigo é considerado um dos melhores substratos, sendo fonte para produção de amilase, fitase, tanase, hemicelulase, protease e pectinase, principalmente quando referido aos fungos do gênero *Aspergillus*. Souza et al. (2005) também constataram que o substrato farelo de trigo foi o que proporcionou uma maior produção de amilase, uma vez comparado com o amido e a maltose, para basidiomicetos.

Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), observaram a produção celulase extracelular utilizando fungos filamentosos isolados de solo em meio contendo papel de filtro e farelo de trigo. Terrasan et al. (2010) testaram a produção de enzimas xilanólíticas pelo fungo *Penicillium janczewski* em vários substratos e observaram uma maior produção em meios contendo farelo de trigo, farelo de aveia e bagaço de cana. Chapla et al. (2010) também testaram o uso de vários resíduos agroindustriais para a produção de xilanase pelo fungo *Aspergillus foetidus* e observaram melhores produções desta enzima em presença de farelo de trigo e farelo de arroz. O *Aspergillus niger* demonstrou capacidade para produzir celulase e xilanase, conforme afirmaram Gokhale (1986) e Aguiar (2000), a partir de bagaço de cana, fonte de carbono abundante e barata no Brasil.

5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram realizadas fermentações em estado sólido com os 75 isolados. O extrato bruto resultante de cada fermentação foi utilizado para os ensaios enzimáticos de xilanase, CMCase e lacase. Todos os isolados foram submetidos a um padrão de fermentação sólida, contendo bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) como substratos.

5.3.1 ATIVIDADE DE XILANASE

A Tabela 10 apresenta a atividade máxima de xilanase atingida por cada isolado, e seu respectivo dia de fermentação. A produção de xilanase dos isolados no período total de fermentação encontra-se no Apêndice 3.

De acordo com os resultados, a produção de xilanase entre os isolados fermentados foi bastante variada, diferenciando a atividade até entre os fungos de mesmo gênero. Apenas 8,0% dos isolados obtiveram produção maior que 50 U/mL e 4% entre 40 a 50 U/mL, sendo todos do gênero *Aspergillus*. Cerca de 18,66% dos isolados produziram entre 10 e 20 U/mL, (maioria do gênero *Trichoderma*) e uma grande parcela dos fungos (69,33%) apresentaram traços de produção de xilanase, com atividade entre 0,5 a 10 U/mL.

Tabela 10: Atividade máxima de xilanase dos isolados.

Gênero	Código	Xilanase (U/mL)	Tempo de Fermentação (h)
<i>Aspergillus</i>	P22	64,0	96
<i>Aspergillus</i>	B21	63,7	144
<i>Aspergillus</i>	B24	60,2	96
<i>Aspergillus</i>	F18	60,0	96
<i>Aspergillus</i>	G25	54,9	96
<i>Aspergillus</i>	B07	52,4	144
<i>Aspergillus</i>	B20	47,9	96
<i>Aspergillus</i>	F12	47,6	144
<i>Aspergillus</i>	G08	43,7	48
<i>Trichoderma</i>	P01	18,3	192
<i>Trichoderma</i>	F28	16,8	144
<i>Mucor</i>	B25	16,8	240
<i>Trichoderma</i>	P20	15,0	96
<i>Fusarium</i>	B02	14,7	144
<i>Penicillium</i>	F08	13,7	144
<i>Trichoderma</i>	B03	13,7	240
<i>Trichoderma</i>	G04	13,5	48
<i>Trichoderma</i>	G28	13,4	144
<i>Trichoderma</i>	P05	12,7	192
<i>Trichoderma</i>	F03	12,4	192
<i>Trichoderma</i>	G17	12,3	240
<i>Mucor</i>	G27	12,2	240
<i>Trichoderma</i>	G19	11,6	240
<i>Trichoderma</i>	G13	9,5	240
<i>Trichoderma</i>	P19	9,4	48
<i>Trichoderma</i>	F02	9,0	48
<i>Trichoderma</i>	P14	8,9	144
<i>Trichoderma</i>	G06	8,8	144
<i>Cunninghamella</i>	G10	8,7	192
<i>Fusarium</i>	P02	8,5	240
<i>Trichoderma</i>	G15	8,0	144
<i>Fusarium</i>	B26	7,9	240
<i>Trichoderma</i>	G03	7,4	192
<i>Trichoderma</i>	F26	6,9	144
<i>Fusarium</i>	G24	6,9	240
<i>Mucor</i>	P03	6,2	192
<i>Trichoderma</i>	B23	6,0	192
F.N.I.*	G20	5,8	240
<i>Trichoderma</i>	B27	5,3	48
<i>Absidia</i>	P18	5,1	240
<i>Fusarium</i>	G02	5,0	96
<i>Trichoderma</i>	B05	4,9	240
<i>Trichoderma</i>	F24	4,6	240
<i>Trichoderma</i>	B13	4,6	240
<i>Trichoderma</i>	B04	4,5	192
<i>Trichoderma</i>	G21	4,4	240
<i>Trichoderma</i>	F06	4,2	192
<i>Trichoderma</i>	G22	4,0	192
<i>Fusarium</i>	F01	3,8	192
<i>Trichoderma</i>	B01	3,6	240
<i>Acremonium</i>	P24	3,6	240
<i>Trichoderma</i>	F22	3,5	144
<i>Trichoderma</i>	F20	3,5	240
<i>Fusarium</i>	F13	3,5	240
<i>Cunninghamella</i>	G01	3,3	96
<i>Fusarium</i>	F10	3,2	240
<i>Cunninghamella</i>	P21	2,9	240
<i>Cunninghamella</i>	B16	2,8	96
<i>Fusarium</i>	F25	2,7	96
<i>Cunninghamella</i>	F19	2,6	144
<i>Cunninghamella</i>	B06	2,5	96
<i>Mucor</i>	P23	2,4	240
<i>Mucor</i>	G23	2,2	192
<i>Fusarium</i>	B19	2,1	240
<i>Fusarium</i>	G26	2,0	240
<i>Paecilomyces</i>	F07	1,9	240
F.N.I.	P25	1,6	240
<i>Cunninghamella</i>	P08	1,5	144
<i>Absidia</i>	F27	1,4	96
<i>Verticillium</i>	F04	1,3	144
<i>Paecilomyces</i>	P07	1,0	240
<i>Cunninghamella</i>	G14	0,7	144
<i>Cunninghamella</i>	B18	0,6	48
<i>Cunninghamella</i>	F16	0,6	192
<i>Mucor</i>	B22	0,5	96

*Fungo não identificado.

A produção de xilanase pelos isolados, quando comparada com a literatura, apresenta-se baixa, entretanto, levando-se em consideração que não houve qualquer padronização de fermentação ou otimização de produção enzimática, tem-se que a atividade da enzima xilanase encontrada pelos isolados responde ao objetivo de separar as cepas de melhor produção.

As melhores atividades de xilanase encontradas neste trabalho derivaram do gênero *Aspergillus*, seguido do gênero *Trichoderma*. Diversos trabalhos apontam estes gêneros como bons produtores de sistemas xilanolíticos. Pandey et al. (2000) destacam a produção de xilanase por ambos os gêneros em resíduos agroindustriais, assim como observado por Lemos & Junior (2002), que encontraram 100 U/mL de xilanase produzida por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana; Reis et al. (2003) que observaram a produção de 220 U/mL por *Aspergillus nidulans*; e Kang et al. (2004) e Biswas et al., (2010), encontraram 5070 U/g e 290 U/mL, respectivamente, de atividade de xilanase por *Aspergillus niger*. Biswas et al. (2010) também observou a produção de 1350 U/mL por *Trichoderma reesei* em palha de milho.

No presente trabalho os isolados do gênero *Mucor*, *Penicillium* e *Fusarium* apresentaram valores medianos de produção de xilanase. Dados semelhantes foram encontrados por Biswas et al., (2010) que observaram a baixa produção de xilanase por fungos do gênero *Penicillium*, assim como Mutheszilan et al. (2007) que verificou a produção de 3,89 U/mL em farelo de trigo; Camassola & Dillon (2007), de 10 U/g em bagaço e farelo de trigo; e Terrasan et al. (2010) de 15,38 U/mL e 3,05 U/mL em farelo de trigo e bagaço de cana, respectivamente.

Entretanto para o gênero *Fusarium* tem-se encontrado elevadas produções de xilanase quando comparado aos encontrado pelos isolados (SAHA, 2002; PANAGIOTOU et al., 2003).

5.3.2 ATIVIDADE DE CMCASE

A Tabela 11 apresenta a atividade máxima de Carboximetilcelulase (CMCase) atingida por cada isolado, e seu respectivo dia de fermentação. A produção de Carboximetilcelulase (CMCase) dos isolados no período total de fermentação encontra-se no Apêndice 4.

Tabela 11: Atividade máxima de CMCase dos isolados.

Gênero	Código	CMCase (U/mL)	Tempo de Fermentação (h)	Gênero	Código	CMCase (U/mL)	Tempo de Fermentação (h)
<i>Fusarium</i>	G24	5,5	48	<i>Fusarium</i>	G26	1,8	240
<i>Aspergillus</i>	B21	5,2	144	<i>Fusarium</i>	B26	1,7	96
<i>Trichoderma</i>	G15	4,7	144	<i>Trichoderma</i>	B23	1,6	144
<i>Trichoderma</i>	P19	4,4	192	<i>Mucor</i>	G27	1,5	144
<i>Trichoderma</i>	F28	4,3	48	<i>Trichoderma</i>	F03	1,5	192
<i>Aspergillus</i>	G08	4,2	144	<i>Absidia</i>	P18	1,5	144
<i>Trichoderma</i>	G19	3,9	192	<i>Trichoderma</i>	F06	1,5	192
<i>Aspergillus</i>	F18	3,8	192	<i>Fusarium</i>	F25	1,5	144
<i>Trichoderma</i>	P20	3,6	192	F.N.I.	G20	1,4	192
<i>Trichoderma</i>	G03	3,4	192	<i>Trichoderma</i>	B03	1,4	192
<i>Aspergillus</i>	F12	3,4	192	<i>Fusarium</i>	B02	1,3	144
<i>Aspergillus</i>	P22	3,3	96	<i>Trichoderma</i>	B04	1,3	192
<i>Trichoderma</i>	P14	3,2	144	<i>Trichoderma</i>	B13	1,2	240
<i>Trichoderma</i>	G13	3,2	240	<i>Cunninghamella</i>	B06	1,2	240
<i>Trichoderma</i>	G28	3,1	144	<i>Trichoderma</i>	G22	1,0	192
<i>Aspergillus</i>	G25	2,9	192	<i>Mucor</i>	P23	0,9	240
<i>Trichoderma</i>	G04	2,9	144	<i>Cunninghamella</i>	G10	0,9	192
<i>Aspergillus</i>	B07	2,6	92	<i>Acremonium</i>	P24	0,8	96
<i>Aspergillus</i>	B24	2,6	192	<i>Cunninghamella</i>	B16	0,8	240
<i>Trichoderma</i>	F02	2,5	48	<i>Cunninghamella</i>	P08	0,8	240
<i>Trichoderma</i>	F24	2,4	96	<i>Trichoderma</i>	B01	0,8	144
<i>Aspergillus</i>	B20	2,3	192	<i>Fusarium</i>	G02	0,8	240
<i>Trichoderma</i>	P05	2,2	144	<i>Cunninghamella</i>	G01	0,8	192
<i>Fusarium</i>	F01	2,2	192	<i>Paecilomyces</i>	F07	0,8	240
<i>Fusarium</i>	F13	2,2	240	<i>Fusarium</i>	F10	0,6	240
<i>Trichoderma</i>	F26	2,2	192	<i>Paecilomyces</i>	P07	0,6	96
<i>Trichoderma</i>	G17	2,2	96	<i>Fusarium</i>	P02	0,6	192
<i>Trichoderma</i>	G06	2,1	144	<i>Mucor</i>	G23	0,5	240
<i>Trichoderma</i>	F22	2,1	192	F.N.I.	P25	0,5	240
<i>Trichoderma</i>	G21	2,1	192	<i>Mucor</i>	B22	0,4	240
<i>Trichoderma</i>	B05	2,1	240	<i>Cunninghamella</i>	F19	0,4	144
<i>Trichoderma</i>	B27	2,0	96	<i>Cunninghamella</i>	F16	0,4	240
<i>Trichoderma</i>	F20	1,9	144	<i>Cunninghamella</i>	G14	0,4	96
<i>Mucor</i>	P03	1,9	192	<i>Cunninghamella</i>	P21	0,4	144
<i>Penicillium</i>	F08	1,9	192	<i>Verticillium</i>	F04	0,3	240
<i>Trichoderma</i>	P01	1,8	144	<i>Cunninghamella</i>	B18	0,3	96
<i>Mucor</i>	B25	1,8	240	<i>Absidia</i>	F27	0,3	144
<i>Fusarium</i>	B19	1,8	240				

*Fungo não identificado.

A produção de CMCase entre os isolados também foi variada, atingindo valores máximos de 5,53 U/mL pelo fungo G24 (*Fusarium*), 5,22 U/mL pelo B21 (*Aspergillus*), 4,67 U/mL pelo G15 (*Trichoderma*) e 4,23 U/mL pelo fungo G08 (*Aspergillus*). Outros isolados de menor produção de CMCase foram: G19 (*Trichoderma*) com 3,90 U/mL; F18 (*Aspergillus*) com 3,80 U/mL, G03 (*Trichoderma*) com 3,40 U/mL; P14 (*Trichoderma*) com 3,24 U/mL e P22 (*Aspergillus*) com 3,26 U/mL.

Como não houve qualquer caracterização de fermentação ou padronização de ensaio enzimático, tem-se que a atividade celulolítica dos isolados comportou-se dentro do esperado. As melhores produções de CMCase pelo gênero *Aspergillus* variaram entre 3,20 e 5,30 U/mL (ou 64 a 106 U/g). Valores similares de produção de celulase foram encontrados por El-Nawwi & EL-Kader (1996) e Kang et al. (2004) que observaram a produção de celulase por fungos do gênero *Aspergillus* e obtiveram uma produção de 129 U/g (em bagaço de cana) e 1,2 U/mL (em milhocina), respectivamente.

Apesar da maior produção de CMCase entre os isolados ter ocorrido pelo gênero *Fusarium* (5,53 U/mL ou 110,6 U/g), a produção dos outros isolados deste mesmo gênero não passou de 3,0 U/mL. Fungos do gênero *Fusarium* são descritos como fungos bons produtores de complexos celulolíticos (BHAT, 2000; CARDOSO et al., 2009), fato também observado por Panagiotou et al. (2003) que demonstraram a produção de 304 U/g de endoglucanase pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

Para o gênero *Trichoderma*, os valores de CMCase encontrados se assemelham ao observado por Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) do qual mostraram uma produção de 1,64 U/mL em farelo de trigo pelo *Trichoderma harzianum*. O gênero *Trichoderma* é conhecido como um dos que melhor atua na degradação do sistema celulósico. Também é conhecido por produzir uma quantidade razoável de celulases extracelulares (ELISASHVILI, 1993). Zhou et al. (2004) observaram a produção de 132 U/mL de celulase pelo fungo *Trichoderma viride*. No presente trabalho, o gênero *Trichoderma* representou o terceiro melhor produtor, tendo cerca de 30% dos isolados desse gênero apresentado uma produção entre 3 a 5 U/mL.

O gênero *Acremonium* apresentou uma atividade celulolítica de 0,80 U/mL. Esta atividade foi um pouco mais elevada quando comparado com os dados obtidos por Almeida (2009) do qual obteve uma atividade de 0,15 U/mL e 0,18 U/mL em presença de bagaço de cana e palha de milho, respectivamente.

A atividade de CMCase pelo fungo *Penicillium* foi relativamente baixa, alcançando uma atividade de 1,89 U/mL, fato também observado por Joglekar &

Karant, citados por Vitti (1988), que verificaram o baixo desenvolvimento de *Penicillium* em algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetil celulose (CMC).

Além do bagaço de cana e farelo de trigo, outros substrato são característicos para o estudo de produção de celulase como casca de coco, casca de arroz, palha de arroz, palha de trigo, silagem, polpa de beterraba, etc (PANDEY, 2000). Da Silva et al. (2005) observaram uma produção de CMCase de 60 U/mL em sabugo de milho e 59 U/mL com palha de milho pelo *Thermoascus aurantiacus miehe*. Assim, pode-se aumentar a produção desta enzima com a caracterização do substrato.

5.3.3 ATIVIDADE DE LACASE

A Tabela 12 apresenta a atividade máxima de lacase atingida por cada isolado, e seu respectivo dia de fermentação. A produção de lacase dos isolados no período total de fermentação encontra-se no Apêndice 5.

Poucos isolados mostraram potencial de produção de lacase, destacando-se a produção pelos fungos do gênero *Fusarium*, *Trichoderma* e *Verticillium* (F04), sendo este último, considerado o maior produtor dentre os isolados, com atividade de 0,50 U/mL.

As enzimas ligninolíticas são uma característica dos fungos basidiomicetos de degradação da madeira ou de podridão braca (TEKERE, READ, MATTIASSON, 2005; TORTELLA, DIEZ, DURAN, 2005), como observado por Tavares et al. (2006) que encontraram 5,6 U/mL produzido pelo fungo *Trametes versicolor* e Giese et al. (2004) com a produção de 12 U/mL pelo fungo *Botryosphaeria* sp., sendo baixa a produção desta enzima por fungos de outras classes. Mesmo a produção de lacase sendo considerada baixa, outros trabalhos também demonstram essa produção como Chakroun et al. (2010) e Sadhasivam et al. (2010), que observaram a produção de 0,66 U/mL e 4,5 U/mL, respectivamente, por fungos do gênero *Trichoderma* e Wu et al. (2010) que encontraram atividade de 0,57 U/mL por *Fusarium*.

Tabela 12: Atividade máxima de lacase dos isolados.

Gênero	Código	Lcase (U/mL)	Tempo de Fermentação (h)	Gênero	Código	Lcase (U/mL)	Tempo de Fermentação (h)
<i>Verticillium</i>	F04	0,507	240	<i>Aspergillus</i>	B07	0,013	96
<i>Fusarium</i>	B02	0,273	240	<i>Aspergillus</i>	G08	0,013	240
<i>Mucor</i>	G23	0,240	240	<i>Cunninghamella</i>	F19	0,012	96
<i>Fusarium</i>	G24	0,240	240	F.N.I.	G20	0,012	240
<i>Fusarium</i>	F13	0,166	240	<i>Trichoderma</i>	B04	0,011	48
<i>Fusarium</i>	B26	0,155	240	<i>Trichoderma</i>	G21	0,010	144
<i>Trichoderma</i>	B01	0,134	48	<i>Trichoderma</i>	B05	0,010	192
<i>Cunninghamella</i>	P08	0,129	144	<i>Trichoderma</i>	B13	0,009	48
<i>Cunninghamella</i>	B06	0,128	144	<i>Aspergillus</i>	B21	0,009	96
<i>Paecilomyces</i>	P07	0,125	192	<i>Trichoderma</i>	P20	0,009	144
<i>Cunninghamella</i>	F16	0,105	192	<i>Trichoderma</i>	P01	0,009	144
<i>Fusarium</i>	F01	0,103	192	<i>Trichoderma</i>	G22	0,009	96
<i>Cunninghamella</i>	B16	0,088	192	<i>Aspergillus</i>	F18	0,008	240
<i>Fusarium</i>	G26	0,075	240	<i>Trichoderma</i>	P05	0,008	240
<i>Fusarium</i>	G02	0,070	240	<i>Trichoderma</i>	B03	0,008	48
<i>Cunninghamella</i>	G01	0,066	192	<i>Trichoderma</i>	G28	0,008	96
<i>Trichoderma</i>	F24	0,058	240	<i>Cunninghamella</i>	G14	0,007	240
<i>Trichoderma</i>	G19	0,052	96	<i>Mucor</i>	B25	0,007	240
<i>Trichoderma</i>	G15	0,048	240	<i>Cunninghamella</i>	P21	0,006	192
<i>Aspergillus</i>	P22	0,039	240	<i>Fusarium</i>	P02	0,006	48
<i>Paecilomyces</i>	F07	0,037	96	<i>Trichoderma</i>	G13	0,005	240
<i>Mucor</i>	P23	0,035	240	<i>Cunninghamella</i>	G10	0,005	192
<i>Absidia</i>	P18	0,034	144	<i>Trichoderma</i>	G17	0,005	144
<i>Fusarium</i>	F10	0,031	240	<i>Trichoderma</i>	P19	0,005	192
<i>Acremonium</i>	P24	0,027	240	<i>Trichoderma</i>	F06	0,004	48
<i>Trichoderma</i>	P14	0,026	96	<i>Aspergillus</i>	G25	0,004	192
<i>Trichoderma</i>	F20	0,026	48	<i>Cunninghamella</i>	B18	0,004	240
<i>Trichoderma</i>	G06	0,025	48	<i>Aspergillus</i>	F12	0,003	96
<i>Trichoderma</i>	B23	0,023	96	<i>Aspergillus</i>	B20	0,003	144
<i>Fusarium</i>	F25	0,023	240	<i>Trichoderma</i>	F02	0,002	144
<i>Penicillium</i>	F08	0,020	240	<i>Mucor</i>	G27	0,002	240
<i>Trichoderma</i>	G03	0,018	96	<i>Trichoderma</i>	B27	0,001	240
<i>Trichoderma</i>	G04	0,017	240	<i>Mucor</i>	B22	0,001	144
<i>Mucor</i>	P03	0,016	144	<i>Trichoderma</i>	F26	0,000	-
<i>Trichoderma</i>	F22	0,016	48	<i>Absidia</i>	F27	0,000	-
<i>Trichoderma</i>	F03	0,016	48	<i>Trichoderma</i>	F28	0,000	-
F.N.I.	P25	0,014	240	<i>Aspergillus</i>	B24	0,000	-
<i>Fusarium</i>	B19	0,014	240				

*Fungo não identificado.

Dentre os isolados, 14,6% obtiveram atividade de lacase entre 0,1 e 0,3 U/mL. São eles: F01 (*Fusarium*), B01 (*Trichoderma*), B02 (*Fusarium*), B06 (*Cunningamella*), P07 (*Paecilomyces*), P08 (*Cunningamella*), F13 (*Fusarium*), F16 (*Cunningamella*), G24 (*Fusarium*), B26 (*Fusarium*), G23 (*Mucor*). Dos onze isolados do gênero *Fusarium*, cinco destes apresentaram potencial para produção de lacase, mostrando que este gênero pode ser considerado como referencia na produção dessa enzima.

5.3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Comparando-se a produção enzimática dos isolados por cada área de coleta, observou-se pouca variação de produção, pode-se concluir que a ação da queima da cana não interfere no potencial enzimático da microbiota local.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que, dentre as linhagens isoladas, não foram encontrados fungos com potencial catalítico muito maior ao já descrito na literatura, entretanto as atividades encontradas serviram para uma prévia seleção de fungos com potencial para produção das enzimas em questão. Destaque-se a importância da realização de estudos futuros com outros resíduos agroindustriais para verificar um melhor potencial enzimático de tais linhagens.

5.4 ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON EM HPLC

5.4.1 TESTE DE DEGRADAÇÃO ESPONTÂNEA

Para minimizar erros e evitar falsos positivos, foi realizado um teste de degradação do diuron sem a presença de inóculo micelial para verificar se o herbicida sofreria algum tipo de degradação espontânea. O teste foi preparado como descrito no item 4.8, com solução de herbicida na concentração de 10mg/L, porém sem a presença do inóculo. Alíquotas foram retiradas de 48 em 48 horas até completar 336 horas de fermentação e analisadas no HPLC como descrito no item 4.9. Este teste foi realizado em duplicata. A Figura 15 mostra o perfil de permanência do diuron no meio de cultivo ao longo do processo fermentativo.

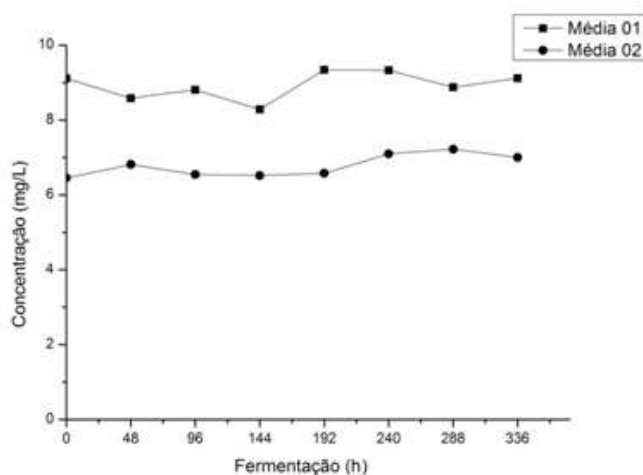


Figura 15: Comportamento do diuron em ausência de fungo.

As soluções foram preparadas na concentração de 10mg/L, porém o gráfico mostra que o diuron não foi totalmente solubilizado, pois cada fermentação apresentou uma concentração diferente (6,5 mg/L e 9,1 mg/L). Essa diferença de concentração pode ser interpretada pela desigual dissolução do diuron no meio de cultivo, confirmando sua difícil solubilidade em meio. Assim, percebeu-se a necessidade de analisar cada fermentação no tempo zero para o real conhecimento da taxa de degradação.

No entanto, mesmo as fermentações apresentando concentrações diferentes, ambas se mantiveram constantes. Logo, pode-se concluir que o diuron não sofre nenhuma degradação espontânea durante a fermentação.

5.4.2 DEGRADAÇÃO DE DIURON PELOS ISOLADOS

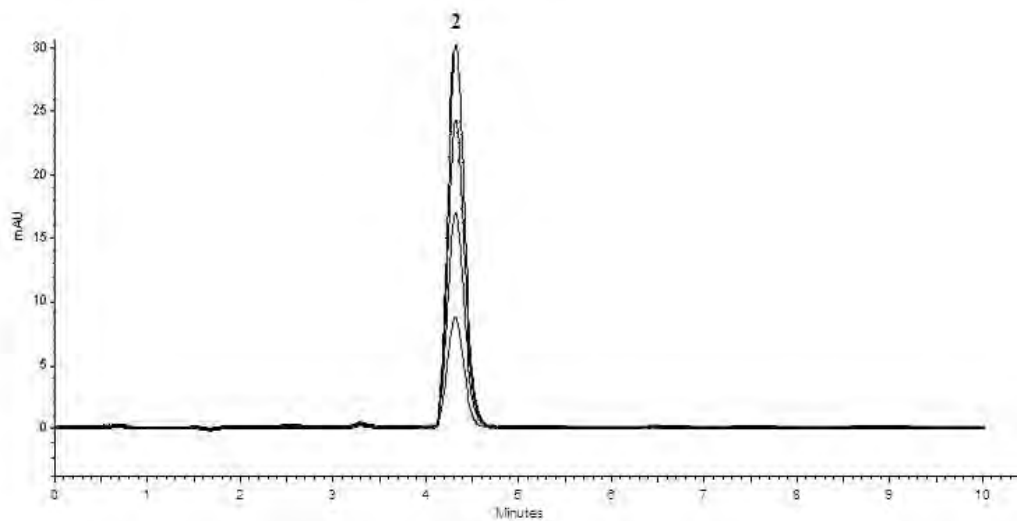
Anterior às análises de degradação, preparou-se soluções de concentração 5, 10, 15 e 20 mg/L do padrão analítico Aldrich Chemistry de diuron para a obtenção da curva padrão. As soluções foram analisadas em HPLC, nas mesmas condições das amostras. A Figura 16a apresenta o cromatograma do padrão do herbicida diuron e seu tempo de retenção de aproximadamente 4,5 minutos.

Foram escolhidos para os testes de degradação do diuron somente um fungo de cada gênero, proveniente de cada coleta do isolamento (Tabela 13). Para cada isolado, realizou-se a fermentação por 5 dias (168 horas), retirando amostras a cada 24 horas. Analisaram-se alíquotas no tempo zero, para verificação do perfil do cromatograma na

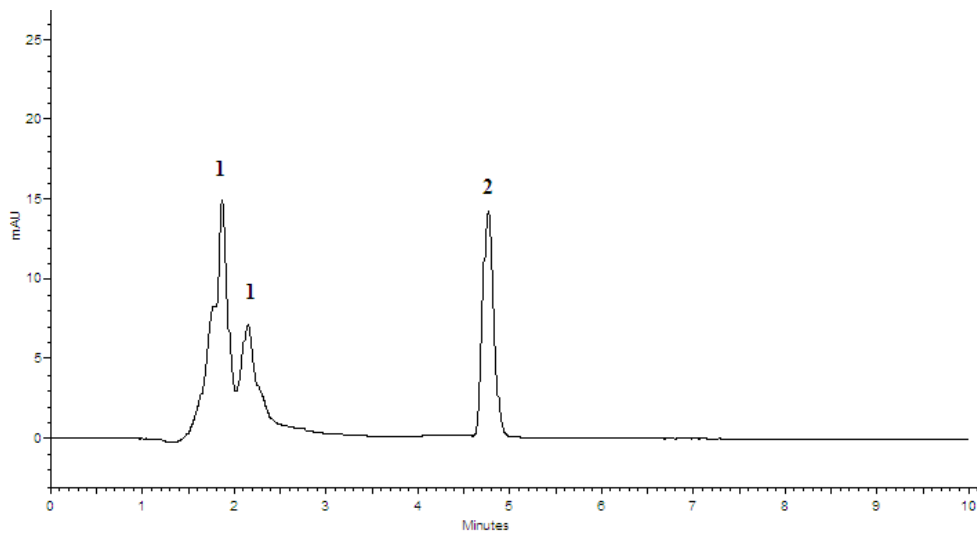
ausência de qualquer produto de degradação. A Figura 16b apresenta o cromatograma modelo no tempo zero de fermentação, sendo os picos gerados entre 1 e 3 minutos referentes ao meio de fermentação e o gerado entre 4 e 5 minutos referente ao herbicida diuron.

A degradação do herbicida diuron pode passar por processos de demetilação, formando primeiramente o produto DCPMU (N-(3,4 diclorofenil)-N-metiluréia) e posteriormente o DCPU (N-(3,4 diclorofeniluréia) e/ou hidrólise formando 3,4 DCA, como já mencionado. Por esse motivo, e pela proposta do presente trabalho em selecionar fungos que apresentassem potencial para a degradação do herbicida diuron, considerou-se dois índices de taxa de degradação: 1) diferença entre as concentrações de diuron das amostras no tempo zero e as do decorrer da fermentação; 2) formação do produto de pico mais próximo ao do diuron (Figura 16c), de tempo de retenção de aproximadamente 3,8 minutos (aqui chamado de pico-produto). A formação de outros picos não foram somadas a taxa de degradação pela possibilidade de serem produtos secundários, ou seja, produtos gerados a partir da degradação do produto primário. Os cromatogramas e a comparação entre as duas taxas de degradação (formação de pico produto e variação de concentração) se encontram no Apêndice 6.

a)



b)



c)

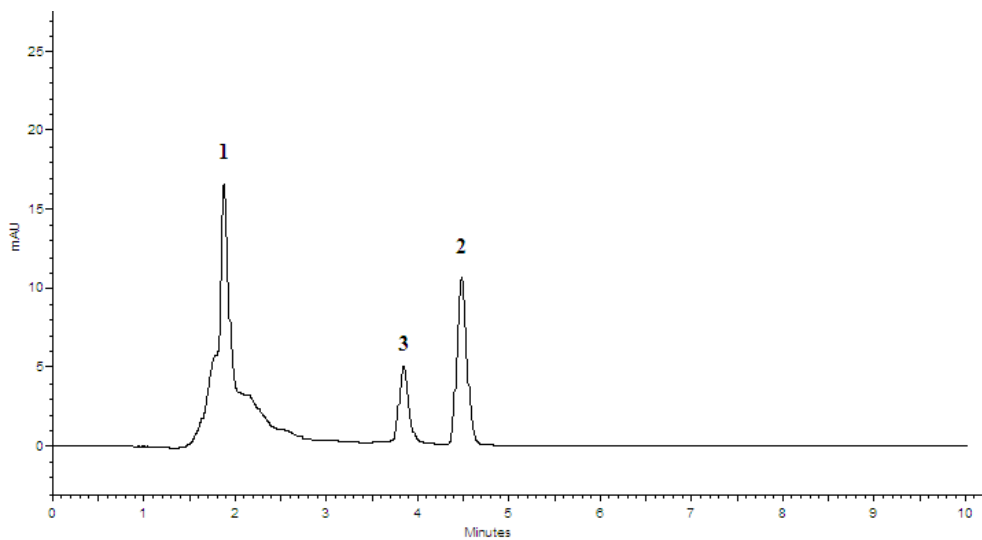


Figura 16: Perfis cromatograficos do meio de fermentação, diuron e seu produto de degradação. a= Padrão de diuron em várias concentrações; b= Perfil modelo de tempo zero de fermentação; c= Perfil modelo de degradação do diuron após 72 horas de fermentação (usando como modelo o fungo *Aspergillus G25*): Pico 1 – componentes do meio de cultura, Pico 2 – diuron, Pico 3 – produto de degradação do diuron.

Dos 23 isolados testados, todos apresentaram a formação do pico-produto, sendo detectada sua formação desde as primeiras 24 horas de fermentação como é o caso do fungo G15 (*Trichoderma*), até o último dia de fermentação. A tabela a seguir mostra os isolados selecionados, com suas respectivas taxas de degradação.

Tabela 13: Porcentagens máximas de degradação pelos isolados selecionados.

Gênero	Código	% de degradação por pico produto	% de degradação por concentração
<i>Aspergillus</i>	G25	47,7	67,16
<i>Mucor</i>	P03	38,33	59
<i>Fusarium</i>	B26	35,77	32,66
<i>Mucor</i>	G23	28,53	34,82
<i>Absidia</i>	F27	23,26	18,81
<i>Mucor</i>	B22	22,88	28,46
<i>Cunninghamella</i>	G01	15,47	38,63
<i>Trichoderma</i>	F28	13,79	18,66
<i>Cunninghamella</i>	F19	13,7	31,12
<i>Cunninghamella</i>	B06	11,89	21,64
<i>Trichoderma</i>	G15	8,09	45,5
<i>Paecilomyces</i>	P07	7,28	19,53
<i>Aspergillus</i>	G08	5,95	37,19
<i>Fusarium</i>	F13	5,1	28,83
<i>Acremonium</i>	P24	4,89	39,02
<i>Trichoderma</i>	B01	4,63	26,71
<i>Absidia</i>	P18	4,55	36,52
<i>Fusarium</i>	B19	4,52	18,19
<i>Aspergillus</i>	P22	4,44	32,06
<i>Verticillium</i>	F04	2,92	20,06
<i>Penicillium</i>	F08	2,15	23,13
<i>Trichoderma</i>	G19	1,78	30,17
<i>Fusarium</i>	B02	1,58	13,71

Considerando a taxa de degradação pela formação do pico-produto, o fungo G25 (*Aspergillus*) foi o isolado com maior potencial de degradação (47,7%), seguido dos fungos P03 - *Mucor* (38,3%), B26 - *Fusarium* (38,33%) e G23 - *Mucor* (28,5%). Entre 10 e 20% de degradação se encontram os fungos G01, F19, B06 e B26, e entre 6 a 10% os fungos P07, F28, G15, F04 e B19. Os demais fungos obtiveram uma degradação menor que 6%, sendo considerada dentro da faixa de erro do experimento.

Entretanto, considerando a diferença de concentração como taxa de degradação, as porcentagens encontradas foram maiores com relação às encontradas pela formação do pico-produto. Este fato pode ser explicado pela possível degradação do herbicida diuron em produtos não detectados no comprimento de onda fixado na metodologia.

O fungo G25 (*Aspergillus*) também foi considerado o isolado com maior potencial de degradação (67,16%), seguido dos fungos P03 - *Mucor* (59,0%) e G15 - *Trichoderma* (45,5%). Entre 30 e 40% de degradação se encontram os fungos G01, G08, G19, G23, F19, B26, P18, P22 e P24 e entre 20 e 30% os fungos F04, F08, F13, B01, B06, B22. Os demais fungos obtiveram uma degradação entre 10 e 20%.

Vários trabalhos já foram relatados mostrando o potencial de degradação de compostos xenobióticos por estes gêneros como observado por Silva et al. (2009) que verificaram a capacidade de transformação de PAHs de 2 a 7 anéis por fungos de solo como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Fusarium*. Bordjiba et al. (2001) realizaram o isolamento de fungos a partir de amostras de solos contaminados e não contaminados com pesticidas e também verificaram o potencial de degradação dos fungos *Aspergillus*, *Absidia* e *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Vroumsia et al. (1996) observaram o potencial de degradação de diuron por vários gêneros como *Cunninghamella* (54%), *Aspergillus* (45%), *Verticillium* (40%), *Penicillium* (39%), *Trichoderma* (33%), *Paecilomyces* (31%), *Acremonium* (29%), *Mucor* (29%), *Fusarium* (27%), *Absidia* (9%).

Três diferentes tipos de cromatogramas foram gerados pelos isolados. O primeiro tipo apresentou a formação somente do pico-produto (Figura 17a). Os outros dois tipos apresentaram a formação de dois picos, um com a formação dos dois picos antes do tempo de retenção do diuron (em 3,1 e 3,7 minutos) (Figura 17b), e o outro com a formação de um pico antes e outro depois, com 3,7 e 5,1 minutos, respectivamente, (Figura 17c).

Comparando os cromatogramas gerados com o cromatograma de degradação do diuron observado por Field (1997) (Figura 18), tem-se que o pico com o tempo de retenção de 3,7 minutos pode ser considerado o produto DCPMU, do qual surge após a demetilação de uma molécula de metil do herbicida. Já o pico de 3,1 minutos e de 5,1 podem ser considerados os produtos DCPMU e DCA, respectivamente. A comparação dos picos formados com os da literatura gera um possível reconhecimento dos produtos formados, entretanto, a afirmação de qual produto foi realmente gerado pela degradação somente poderia ser feita com a aplicação das amostras em espectrofotômetro de massa.

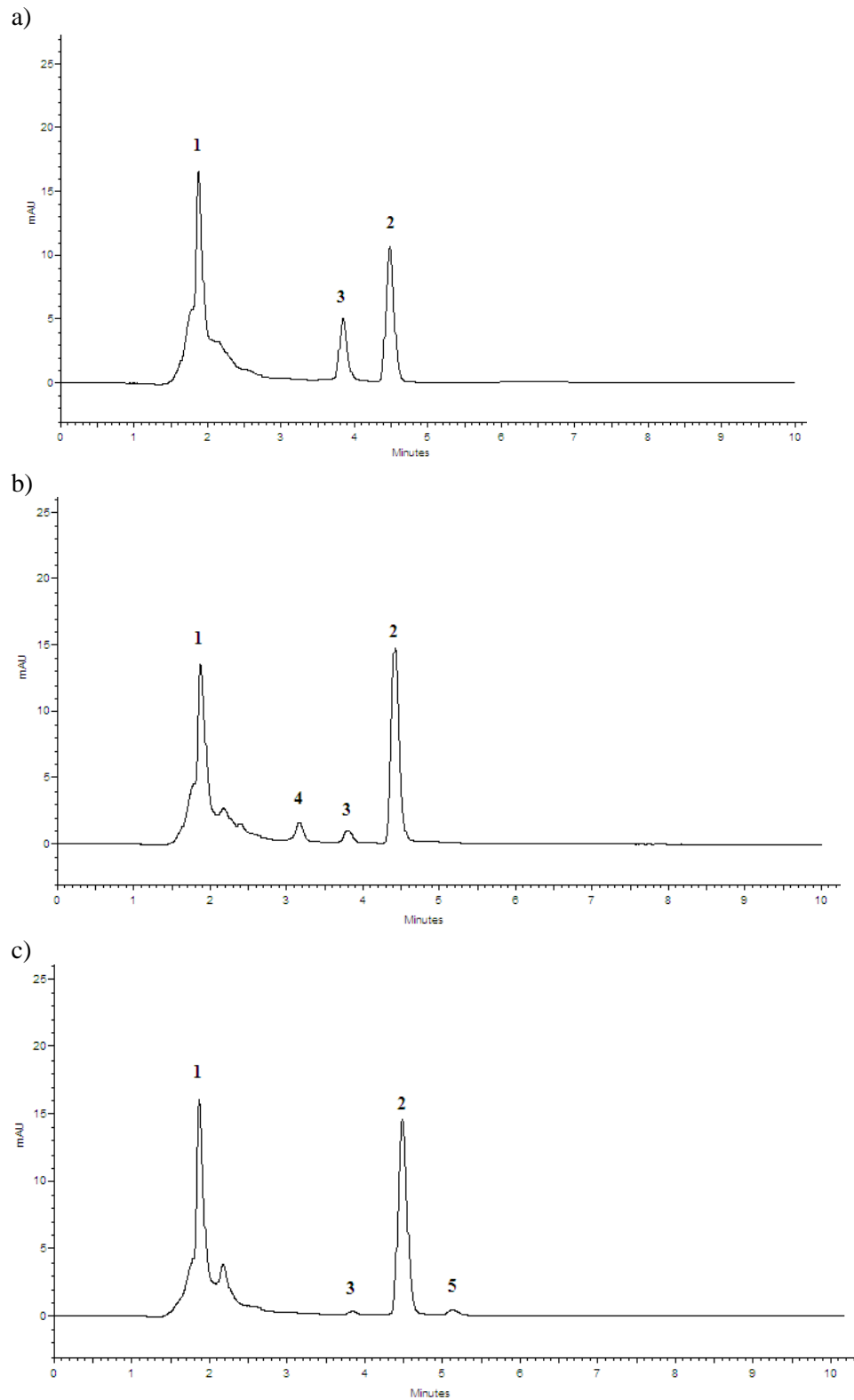


Figura 17: Perfis cromatográficos da degradação do diuron e consumo de meios de cultura pelos fungos isolados, em diferentes tempos. a= Formação de um pico produto (usando como modelo o fungo *Aspergillus* - G25); b= Formação de dois picos produto, ambos antes do diuron: (usando como modelo o fungo *Trichoderma* - F28) c= Formação de dois picos produto, um antes e outro depois do diuron: (usando como modelo o fungo *Fusarium* - B19). Pico 1: componentes do meio de cultura; Pico 2: diuron; Pico 3, 4 e 5: produtos de degradação do diuron.

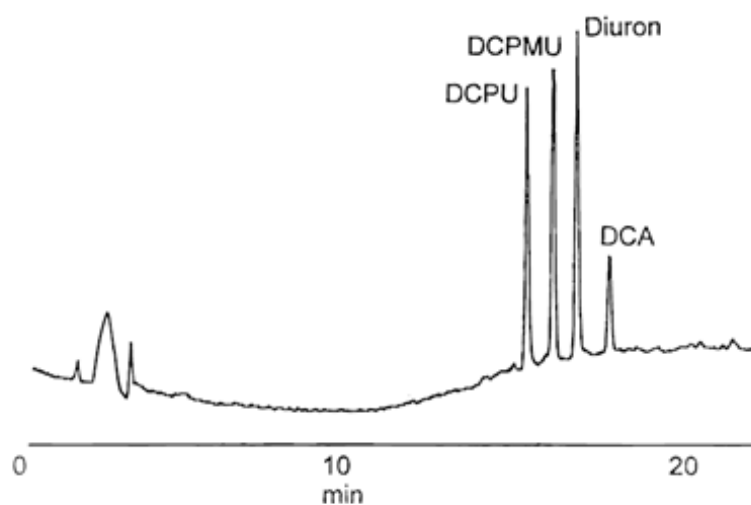


Figura 18: Cromatograma típico de HPLC (detecção UV, 252 nm) indicando o diuron e seus metabólitos (Fonte: FIELD, 1997).

Mesmo apresentando diferentes valores de degradação, todos os fungos testados foram considerados com potencial para degradação do herbicida diuron. Sabendo-se que os testes foram realizados até o período de 168 horas, propõe-se analisar o potencial de degradação dos isolados em um período maior de fermentação para verificar a formação de outros produtos ou até mesmo o desaparecimento total do herbicida no meio.

A formação de outros compostos pela degradação do diuron pode fornecer o surgimento de produtos com maior potencial tóxico que o composto de origem, sendo interessante encontrar agentes que possuam mecanismos de degradação que diminuam a concentração do herbicida sem a formação de tais produtos. Entretanto, a capacidade de degradação desses fungos indica a sua habilidade de crescer em meios contendo diuron, podendo ser utilizados em estudos de biorremediação de herbicidas clorados por meio de técnicas de bioaugmentação ou bioestimulação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As coletas realizadas em solo de plantação de cana-de-açúcar proporcionaram o isolamento de 75 linhagens fúngicas, de 10 gêneros diferentes. A maioria dos gêneros foi encontrada no isolamento da segunda coleta, podendo-se interpretar como o efeito direto à correção do solo e aplicação dos herbicidas no solo.
- Os substratos farelo de trigo e papel de filtro foram considerados os melhores para o isolamento de diferentes gêneros, porém uma maior quantidade de fungos foi isolado na presença do substrato glicose (28%), seguido de farelo de trigo (26,6%), bagaço de cana (25,33%) e papel de filtro (20%).
- Verificou-se que o potencial de produção enzimática dos fungos independe do meio ou área ao qual foram isolados, mas está relacionado com os gêneros de cada fungo como foi o caso do gênero *Aspergillus* na produção de xilanase, *Fusarium* para CMCase e *Verticillium* para lacase. Observou-se também um comportamento similar nos isolados quanto à produção de xilanase e CMCase, sendo o isolado que produziu número significativo de xilanase, também foi considerado produtor de CMCase, caso não observado com a enzima lacase.
- Os isolados do gênero *Mucor* não se mostraram com potencial de produção enzimática, entretanto apresentaram capacidade de degradação do herbicida diuron.
- Para os isolado com maior expressão enzimática, cabe ressaltar a importância de novas fermentações, variando-se o substrato para o estudo do aumento e indução da produção das enzimas.
- Comparando-se a atividade enzimática entre os isolados das áreas de solo com queimada e solo de palha, pode-se concluir que a ação da queima da cana não interfere no potencial enzimático dos microrganismos, entretanto interfere na diversidade da microbiota local.

- Para os fungos fermentados em presença de herbicida diuron, todos foram considerados com potencial para degradação do herbicida, propondo-se assim continuar a análise do potencial de degradação em um período maior de fermentação para verificar a formação de outros produtos ou até mesmo o desaparecimento total do herbicida no meio.

7. CONCLUSÃO

Os fungos são um grupo importante de microrganismos que participam ativamente na biotransformação de compostos no meio em que vivem. Pelos testes realizados no presente trabalho pode-se concluir que fungos de solo possuem o potencial de produção de diversas enzimas de interesse industrial, assim como apresentam capacidade de degradar xenobióticos.

8. REFERENCIAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. produção de celulases e xilanase por *aspergillus niger* iz9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. B.CEPPA, 18, 1, 5770, 2000.

ALMEIDA, M. N. Celulases e hemicelulases de espécies de *Acremonium* endofíticos. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Faculdade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALVAREZ, I. A.; CASTRO, P. R. C. Crescimento da parte aérea de cana crua e queimada. Scientia Agrícola, 56, 4, 1069-1079, 1999.

AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: A review. [Bioresource Technology](#), 79, 3, 277-299, 2001.

ANDAV – Associação Nacional dos Distribuidores de Insumos Agrícolas e Veterinários. Disponível em: < <http://www.andav.com.br/home.aspx>>. Acesso em: Maio/2010.

ANGELO, R. S. Xilanases de *Aspergillus* sp. 2M1: Produção, caracterização e aplicação no branqueamento de polpas kraft. 1995. 128f. Dissertação (Área de Mestrado não citada) – Unicamp, Campinas.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, T. R. M.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio corumbataí e o risco de poluição hídrica. Química Nova, 28, 6, 975-982, 2005.

BAILEY, M. J.; PULS, J.; POUTANEN, K. Purification and properties of two xylanases from *Aspergillus oryzae*. Biotechnology Applied Biochemistry, 13, 380-389, 1991.

BAKRI, Y.; AI-JAZAIRI, M.; AL-KAYAT, G. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus niger* SS7 in submerged culture. Polish Journal of Microbiology, 57, 3, 249-251, 2008.

BALDRIAN, P. Fungal Laccases – Occurrence and Properties. FEMS Microbiology Reviews, 30, 2, 215-242, 2006.

BARBOSA, M. A. L. V. Os impactos ambientais causados pela monocultura da cana-de-açúcar no município de Americano do Brasil. 2006. 30f. (Monografia – Título de Licenciatura), Faculdade de Educação e Ciências Humanas de Anicuns. Anicuns.

BARRON, G. L. The Genera of Hyphomycetes from Soil. New York: Robert E. Krieger Publishing Co., 1968, 364p.

BATISSON, I.; PESCE, S.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; BOHATIER, J. Isolation and Characterization of Diuron-degrading Bacteria from Lotic Surface Water. *Microbial Ecology*. 54, 761-770, 2007.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology Biotechnology*, 56, 326-338, 2001.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulase degradation. *Annual Review of Microbiology*, 44, 219-248, 1990.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18, 355-383, 2000.

BIELY, P. Microbial xylanolytic system. *Trends in Biotechnology*. 3, 286-290, 1985.

BISWAS, R.; SAHAI, V.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010.

BLANCO, F. M. G. Controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. In: Reunião itinerante de fitossanidade do instituto biológico, 9. *Anais...* São Paulo: Instituto Biológico, 2003, 83-89.

BOLETIM INFOSUCRO

<www.ie.ufrj.br/infosucro/boletim/BoletimInfoSucroN0003.pdf> Acesso em: Maio, 2010.

BOLLAG, J. M.; MINARD, R. D.; LIU, S. Y. Cross-linkage between anilines and phenolic humus constituents. *Environmental Science and Technology*, 17, 2, 72-80, 1983.

BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 30, 418- 426, 2001.

BRANCHI, B.; GALLI, C.; GENTILI, P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication radical cation ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: An apparent paradox. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3, 2604-2614, 2005.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in golgfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, 117-124, 2000.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*. 331, 232-238, 2002.

BRUSSLAN, J.; HASELKORN, R. Resistance to the photosystem II herbicide diurom is dominant to sensitivity in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. The EMBO Journal, 8, 1237-1245, 1989.

BUSSE, M. D. RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry, 33, 12/13 1777-1789, 2001.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiology Letters, 128, 81-88, 1995.

CAMARGO, A. M. M. P.; CASER, D. V.; CAMARGO, F. P.; OLIVETTE, M. P. A.; SACHS, R. C. C.; TORQUATO, S. A. Dinâmica e tendência da expansão da cana-de-açúcar sobre as demais atividades agropecuárias, Estado de São Paulo, 2001-2006. Informações Econômicas, SP, v.38, n.3, 2008.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grow on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. Journal of Applied Microbiology. 103, 2196-2204. 2007.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. 2001. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. < http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20_Vanderlei%20Fina_.pdf>. Acesso em: Dezembro/2009.

CANNA-MICHAELIDOU, S.; NICOLAOU, A. Evaluation of the genotoxicity potential (by MutatoxTM test) of en pesticides found as water pollutants in Cyprus. The Science of the Total Environment, 193, 27-35, 1996.

CARDOSO, M. L.; OLIVEIRA, H. S. S.; UETANABARO, A. N. T.; KAMIDA, H. M. Biodegradação de celulose e lignina por fungos: Uma breve revisão. Sitientibus Série Ciências Biológicas, 9, 1, 35-39, 2009.

CAVALCANTI, L.S. Papel da celulase XF-0818 na interação *Xylella fastidiosa* X citrus. 2005. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CHAKROUN, H.; MECHICHI, T.; MARTINEZ, M. J.; DHOUIB, A.; SAYADI, S. Purification and characterization of a novel laccase from the Ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. Process Biochemistry 45, 507-513, 2010.

CHAPLA, D.; DIVECHAB, J.; MADAMWARA, D.; SHAHA, A. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification. Biochemical Engineering Journal 49, 361-369, 2010.

CHEN, W., MULCHANDANI, A. The use of "live biocatalysts" for pesticide detoxification. 16,71-76, 1998.

- CHILDS, G. M. F. Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado. 2007. 70f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, São Paulo.
- CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93-96, 2004.
- COLLA, L.M.; PRIMAZ, A. L.; DE LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciência e agrotecnologia*, 32, 3, 809-813, 2008.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23, 2005.
- COLOMBO, J.; CABELLO, M.; ARAMBARRI, A.M. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfected and lignolitic fungi. *Environmental Pollution* 94, 355-362, 1996.
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e Toxidez. *Pesticida: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15, 65-72, 2005.
- CTC – Centro de Tecnologia Canavieira. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/site/>>. Acesso em: Maio/2010.
- DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and cmc case on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe, *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 235-241, 2005.
- D'ANNIBALE, A.; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 28–36, 2006.
- DEGROOD, S.H.; CLAASSEN, V.P.; SCOW, K.M. Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 7, 8, 1427-1435, 2005.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Isolation of diurom-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 6, 999-1003, 2004.
- DYK, J. S. V.; SAKKAB, M.; SAKKAB, K.; PLETSCHEA, B. I.; Characterisation of the multi-enzyme complex xylanase activity from *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Technology* 47, 174-177, 2010.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. *Compendium of soil fungi*. London: Academic Press, 2, 1980, 859p.

- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28, 83-99, 2000.
- DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 7, 907-931, 2002.
- EERD, L.L.V.; HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganism. *Weed Sciences*, 51, 472-495, 2003.
- EL-NAWWI, S. A.; EL-KADER, A. A. Production of single-cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. *Biomass and Bioenergy*, 1, 4, 361-364, 1996.
- ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 29, 257-266, 1993.
- ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 21, 19416-19425, 2003.
- ESBERARD, R. R.; CHAIM, R. V.; TUROLLA, F. A. Custos de produção como diferencial estratégico: O caso do setor sucroalcooleiro. *Revista Administração em Diálogo*, 13, 2, 73-90, 2009.
- ESPOSITO, E.; PAULILLO, S.M.; MANFIO, G.P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomycetes. *Chemosphere*, 37, 3, 541-548, 1998.
- ESTEBAN, R.; CHORDI, A.; VILLA, T.G. Some aspects of a 1,4- beta -D-xylanase and a beta-D-xylosidase secreted by *Bacillus coagulans* strain 26. *FEMS Microbiology Letters*, 17, 163-166, 1983.
- FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos na Brasil: Os sistemas oficiais de informação e desafios para a realização de estudos epidemiológicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12, 1, 25-38, 2007.
- FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A.M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 59-65, 2003.
- FIELD, J.A.; REED, R. L.; SAWYER, T. E.; MARTINEZ, M. Diuron and Its Metabolites in Surface Water and Ground Water by Solid Phase Extraction and In-Vial Elution. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3897-3902, 1997.
- FISPQ – FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS. Nome do produto: DIURON NORTOX 500 SC - FISPQ n°: 05/2002 - Data da última revisão: 30/07/2004

- FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, 23, 4, 504-511, 2000.
- GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. C.B.S. *Course of Mycology*. 4th ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998, 165p.
- GARCIA, E. S. Biodiversity, Biotechnology and Health. *Caderno de Saúde Pública*, 11, 3, 495-500, 1995.
- GAMA-RODRIGUES, E.F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (eds.). *Fundamentos da material orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Millenium, p.09-26, 1999.
- GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere*, 56, 1021-1032, 2004.
- GIANFREDA, L.; MORA, M. L.; DIEZ, M. C. Restoration of polluted soils by means of microbial and enzymatic processes. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 6, 1, 20-40, 2006.
- GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra celular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 339-354, 2004.
- GIESE E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H. E.; BARBOSA, A. M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringa*, 26, 4, 463-470, 2004.
- GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILBURN, D.G.; MILLER, R. Jr.; WARREN, R.A.J. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews*, 55, 2, 303-315, 1991.
- GOKHALE, D. U. Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biotechnology Letters*, 8, 137-138, 1986.
- GOLOVLELA, L.A.; ALIYEVA, R.M.; NAUMOVA, R.P; GVOZDYAK, P.I. Microbial bioconversion of pollutants. *Review of environmental contamination and toxixology*, 124, 41-78, 1992.
- GRAYSTON, S. J.; JONES, D. V. D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*, 5, 1, 29-56, 1996.
- GUTIERREZ – ROJAS, M.; TORRES, E.F. *Curso de Fermentaciones em Medio-Sólido – Biotecnología para el Aprovechamiento de Resíduos Agroindustriales y Municipales*. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases, *Bioresource. Technology*, 58, 2, 137-16, 1996.

- HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, E.M.; ZUBERER, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*, 48, 89-93, 2000.
- HEAD, I.M. Bioremediation: Towards a credible technology. *Microbiology*, 144, 599-608, 1998.
- HOWARD, G. T.; ELLIOTT, L. P. Effects of cellulolytic ruminal bacteria and of cell extracts on germination of *Euonymus americanus* L. seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1, 218-224, 1988.
- HURST, C.; CRAWFORD, R. L.; GARLAND, J. L.; LIPSON, D. A.; MILLS, A. L. *Manual of environmental microbiology*, ASM Press, 1997, 894 p.
- JEFFRIES, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases, *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 337-342, 1996.
- JOHNSON, M.J.; LEE, K.; SCOW, K.M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, 114, 279-303, 2003.
- KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*, 82, 215-217, 2002.
- KANG, K. H.; DEC, J.; PARK, H.; BOLLAG, J. M. Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Research*, 36, 4907-4915, 2002.
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91, 153-156, 2004.
- KARLEN, D. L.; DITZLER, C. A.; ANDREWS, S. S. Soil quality: why and how? *Geoderma*, 114, 3/4, 145-156, 2003.
- KEARNEY, P. C.; PLIMMER, J. R. Metabolism of 3,4-dichloroaniline in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20,3, 584-585, 1972.
- KHENG, P. P.; OMAR, I. C. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *Songklanakarin. Journal of Science and Technology*, 27, 2, 325-336, 2005.
- KIRK, T. K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W. J.; LORENZ, L. F.; ZEIKUS, J. G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117, 277-285, 1978.
- KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 11, 4/6, 1073-1078, 2001.

- KOUKIEKOLO, R.; CHO, H. Y.; KOSUGI, A, INUI, M.; YUKAWA, H.; DOI, R.H. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7, 3504–11, 2005.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 411-456, 1999.
- LAL, R. Basic concepts and global issues: soil quality and agricultural sustainability . In: LAL, R. (ed.) *Soil quality and agricultural sustainability*. Ann Arbor Science, Chelsea, 3-12, 1998.
- LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. *Soil Science*, 165, 1, 73-86, 2000.
- LEHNINGER, A.L. *Bioquímica: componentes moleculares das células*, Ed. Edgard Blücher Ltda v.1, 1976, 182p.
- LE MOS, J. L. S.; JUNIOR, N. P. Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation, *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 45, 4, 431-437, 2002.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N. S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 27, 115-185, 1999.
- LISBOA, R.; SENA, J.; DUTRA, T. Uso de agrotóxicos na produção de hortaliças da bacia hidrográfica do Natuba, afluente do Tapacurá, PE, e conseqüências sobre o meio ambiente e saúde dos agricultores. CEFET, 2007.
- LUCA, E. F.; FELLER, C.; CERRI, C. C.; BARTHÈS, B.; CHAPLOT, V.; CAMPOS, D. C.; MANECHINI, C. Avaliação de atributos físicos e estoques de carbono e nitrogênio em solos com queima e sem queima de canavial. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32, 789-800, 2008.
- LUIZÃO, R.C.; CAMPISTA, D. & COSTA, E.S. Efeito da idade e do manejo das pastagens da Amazônia Central sobre a biomassa microbiana e suas atividades no solo. In: *Simpósio Brasileiro Sobre Microbiologia Do Solo*, 2, Anais. São Paulo, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1991, 49.
- MACIEL, G.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja. 2006. 146f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. *Revista Thema*, 07, 02, 2010.
- MARCONDES, D. M. S. S. V.; SILVA, D. M.; VITTI, L. S. S.; SILVA, J. C. Celulase do extrato de rúmen bovino. *Energia Nuclear e Agricultura*, 5, 2, 145-160, 1983.

MARQUES D. Guia da cana-de-açúcar: avanço científico beneficia o país. Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 2009. Disponível em: <<http://www.cib.org.br>>. Acesso em: Julho/ 2010.

MARQUES, T. A.; SASSO, C. G.; SATO, A. M.; SOUZA, G. M. Queima do canavial: Aspectos sobre a biomassa vegetal, Fertilidade do solo e emissão de CO₂ para atmosfera Biosci. J., 25, 1, 83-89, J. 2009.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C.M. M. S.; FAY, E. F. Caracterização de Bactérias e Fungos envolvidos na Degradação de Sulfentrazona em Solos. Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna, 1516-4675, 2008.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry, 60, 6, 551-565, 2002.

MENDONZA, H. N. S.; LIMA, E.; ANJOS, L. H. C.; SILVA, L. A.; CEDDIA M. B.; ANTUNES, M. V. M. Propriedades químicas e biológicas de solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 24, 201-207, 2000.

MENTEN, J.O.M.; SAMPAIO, I. A.; MOREIRA, H.; FLÔRES, D.; MENTEN, M. O setor de defensivos agrícolas no Brasil. AgrolinkFito. 2010. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=114571>>. Acesso em: Julho/2010.

MESQUITA, C. M. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos na microbiota do solo. Estudo de caso: Paty do Alferes – RJ. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

MILLER, G.L. Analytical Chemistry, 31, 426, 1959.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: Fevereiro/2010

MINISTÉRIO DE DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2009. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/portal/>>. Acesso em: Fevereiro/2010.

MONCADA, A. Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch, 2005. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/diuron.pdf>>. Acesso em: Dezembro/2009.

MORENO, C. M.; BECERRA, A. G.; SANTOS, M. J. B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Revista Iberoamericana de Micología, 21, 103-120, 2004.

- MOORMAN, T. B. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological and management effects. In: HATFIELD, J. L.; STEWART, B. A. (Eds.). Soil Biology. Effects on soil quality. Boca Raton: CRC Press, 121-169, 1994.
- MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. Environmental Chemistry Letters, 1, 145-148, 2003.
- MUSUMECI, M.P.; NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C.; MATALLO, M.B.; ANDREA, M.M. Degradação do diuron-14C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 30, 775-778, 1995.
- MUTHEZHILAN, R.; ASHOK, R.; JAYALAKSHMI, S. Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. African Journal of Microbiology Research, 20-28, 2007.
- NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 54, 655-670, 2003.
- NEBEKER, A. V.; SCHUYTEMA, G.S. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater Cladocerans, Amphipods, Midges, Minnows, Worms and Snails. Archives of Environmenta Contamination and Toxicology, 35, 441-446, 1998.
- OLIVEIRA JR., R. S. O. Capítulo 6 - INTRODUÇÃO AO CONTROLE QUÍMICO. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá. 2001. <http://www.dag.uem.br/napd/up/public_614230_WPS5MErSXrfA.pdf>. Acesso em: Janeiro/2010.
- PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Advances in Microbial Ecology, New York, v. 9, n. 1, p. 1-55, 1986.
- PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. Bioresource Technology, 101, 7563-7569, 2010.
- PALJEVAC, M.; PRIMOZIC, M.; HABULIN, M.; NOVAK, Z.; KNEZ, Z. Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulose immobilized on silica gels at low and high pressures. Journal of Supercritical Fluids, 43, 74-80, 2007.
- PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Industrial Crops and Products, 18, 37-45, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. Bioresources. Technology, 74, 69-80, 2000.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. Asiatech Publishers, 221, 2001.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. (Eds.) Soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press, 1996, 340p.
- PEREIRA, L.T.C; LEMOS, J. . S.; DOS SANTOS, R. L. C, Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilu*. Centro de Tecnologia Mineral Ministério da Ciência e Tecnologia Coordenação de Desenvolvimento Sustentável (CETEM). CT2004-085-00 – Comunicação Técnica elaborada para a XII JIC-CETEM, 2004.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado Técnico 102, Embrapa, 2005.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Applied Microbiology Biotechnology, 67, 577-591, 2005.
- POTIN, O.; RAFINN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. International Biodeterioration & Biodegradation, 54, 45-52, 2004.
- POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. Soil Biology and Biochemistry, 19, 159-164, 1987.
- PRADE, R. A. Xylanases from biology to biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 13, 101-131, 1995.
- RAGO, J. P.; COLSON, A. M. Molecular basis for resistance for Antimycin and Diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 239, 12564-12570, 1988.
- RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. Annu. Rev. Microbiol. 57, 369–394, 2003.
- REIS, S.; COSTA, M. A. F.; PERALT, R. M. Xylanase production by a wild strain of *Aspergillus nidulans*. Acta Scientiarum: Biological Sciences. 25, 1, 221-225, 2003.
- RIBEIRO, Helena. Queimadas de cana-de-açúcar no Brasil: efeitos à saúde respiratória. Rev. Saúde Pública, vol.42, n.2, pp. 370-376, 2008.
- RINGLIN, D.; VAN ALFEN, N.K. Extra- and intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. Applied Environmental Microbiology, 59, 3634-3639, 1993.

- RISER-ROBERTS, E. Remediation of Petroleum Contaminated Soils (Biological, Physical and Chemical Process). Lewis Publishers, 277-292, 1998.
- RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. L. Environmental biotechnology: principles and applications. New York: McGraw-Hill, 2001, 754p.
- RITZ, K.; YOUNG, I. M. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, 18, Part 2, 2004.
- ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 626-644, 1989.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. Guia de Herbicidas. 4ed. Londrina: Edição dos Autores, 495-498, 1998, 648p.
- ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. *Scientia Agricola*, 57, 4, 723-728, 2000.
- ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, 25, 1, 39-67, 2001.
- RUEGGER, M. J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 27, 2, 205-211, 2004.
- SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 37, 11, 1279-1284, 2002.
- SAHA B. C. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Bioresource Technology*, 90, 33-38, 2003.
- SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43, 736-742. 2008.
- SALVESTRINI, S.; DI CERBO, P.; CAPASSO, S. Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere*, 48, 69-73, 2002.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. Introduction to food-airborne fungi. 6th ed., Baarn: Centraalbureau voor chimmelcultures, 2000, 389p.
- SANDAA, R.A.; ENGER, Ø.; TORSVIK, V. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. *Soil Biology Biochemistry*, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 265-68, 1998.
- SÃO PAULO. Lei n. 11.241, de 19 de setembro de 2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas. Coletânea de Políticas Públicas, Legislação e Normas em Meio ambiente.

- SAUERBECK, D.R.; HELAL, H.M.; NONNEN, S. & ALLARD, J.L. Photosynthate consumption and carbon turnover in the rhizosphere depending on plant species and growth conditions. In: Colóquio Regional Sobre Matéria Orgânica Do Solo, 1, Piracicaba, Anais. Piracicaba, CENA, PROMOCET, 1982. 171-174.
- SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK J.B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 13,359-366, 2002.
- SHULEIN, M. Protein engineering of cellulases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 2, 239-252, 2000.
- SILVA, J. H.; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24, 669-674, 2000.
- SILVA, I.S.; GROSSMAN, M.; DURRANT, L. R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 224–229, 2009.
- SILVA JUNIOR, F.M.R.; PEREIRA, S. V. Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos isolados de solo contaminado por metais pesados. *Revista Brasileira de Biociências*, 5, 2, 903-905, 2007.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental, Instituto Agronômico de Campinas (SP), 2007.
- SOUZA, Z. M.; PRADO, R. M.; PAIXÃO, A. C. S.; CESARIN, L. G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 3, 271-278, 2005.
- SPADOTTO, C.A. Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2002.
- SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. *Geoderma*, Amsterdam, 114, 3/4, 143-144, 2003.
- STALEY, J. T.; GOSINK, J.J.. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 53: 189-215, 1999. Citado por: CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Disponível em <http://www.inpa.gov.br/~cpca/charles/pdf/Canhos-Manfio_Rec-biol_2001.pdf>. Acesso em: Dezembro/2009.
- STRATTON, G. W.; STEWART, K. E. Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil. *Environmental Toxicology Water Quality*, 17, 223-236, 1992.
- SUNNA A, ANTRANIKIAN G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 39-67, 1997.

TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; PLAZAS, I. H. A. Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. *Scientia Agricola*, 58, 3, 501-508, 2001.

TAVARES, A. P. M. Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira. 2006. 190f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Aveiro, Portugal.

TEKERE, M.; READ, J. S.; MATTIASSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures and selected sub-tropical white rot fungi. *Journal of Biotechnology*, 115, 367-377, 2005.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Bioresource Technology* 101, 4139-4143, 2010.

TIMMIS, K. N.; PIEPER, D. H. Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol*, 17, 201-204, 1999.

TIXIER, C.; BOGAERTS, P. SANCELME, M.; BONNEMOY, F.; TWAGILIMANA, L.; CUER, A., BOHATIER, J.; VESCHAMBRE, H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. *Pest Management Science*, 56, 455-462, 2000.

TOMAZ R.M.A.G. Avaliação de fungos com potencial de degradação de Diuron e Pyriothobac-sodium. 2003. 134f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia de Química, Campinas.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; BORGNE, S. L. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*. 46: 1-15, 2003.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 782-87, 1990.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. Novel technics for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 64, 53-62, 1998.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 3, 240-245, 2002.

TORTELLA, G.R.; DIEZ, M.C.; DURAN, N.; Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 197-212, 2005.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresources Technonogy*, 72, 169-183, 2000.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. *Biotecnologia*, Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.

UNICA – UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2005. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: Julho/2010.

URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; deOLIVEIRA, O. C.; LIMA, E.; GUIMARÇÃES, D. H. V. A importância de não queimar a palha na cultura de cana-de-açúcar. *Comunicado Técnico*, 5, p. 1-6, 1991.

VAN DER BROECK, H.C.; DE GRAAFF, L.L., HILLE, J.D.R., VAN OUYEN, A.J.J.; HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of xylanase in bread making and preparation of feed and paper products. *European Patent Application*, 90, 202-220, 1990.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímica, *BNDS Setorial*, 24, 69-96, 2006.

VITTI, L. S. S. Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana. 1988. 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemistry*. 3. Ed. John Wiley & Sons, 2004, 1606p.

VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGI- MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J.L.; KHADRANI, A. Biodegradation of three Substituted Phenylurea Herbicides (Chlortoluron, Diuron, And Isoproturon) by Soft Fungi. A Comparative Study.. *Chemosphere*, 33, 10, 2045-2056, 1996.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. *Plant Soil*, 134, 209-219, 1991.

WOLFF, N. A. Caracterização enzimática das celulases XF-810, XF-818, XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação d proteína XF-818, expressa em *Escherichia coli*. 2002. 196f. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Piracicaba.

WU, Y. R.; LUO, Z. H.; CHOW, R. K. K.; VRIJMOED, L. L. P. Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresource Technology*, 101, 24, 9772-9777, 2010.

ZHENG, L.; DU, Y.; ZHANG J. Biobleaching effect of xylanase preparation from an alkaliphilic *Bacillus* sp. on ramie fibers. *Biotechnology. Letters*. 22, 1363-1367, 2000.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 20,3, 391-411, 2003.

ZHOU, X.; CHEN, H.; LI, Z. CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis. [Enzyme and Microbial Technology](#), **35**, 5, 6, 455-459, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE 1A – Fixa de identificação

1- CÓDIGO _____

2. ISOLAMENTO

2.1 Data ___/___/___

2.2 Local _____

2.3 Período _____

2.4 Substrato de origem _____

2.5 Temperatura de isolamento _____ °C

3. IDENTIFICAÇÃO _____

3.1 Macroscopia da colônia

3.2 Microscopia da colônia

4- MEDIÇÕES E OBSERVAÇÕES

Após 3 dias _____

Após 5 dias _____

Após 7 dias _____

Após __ dias _____

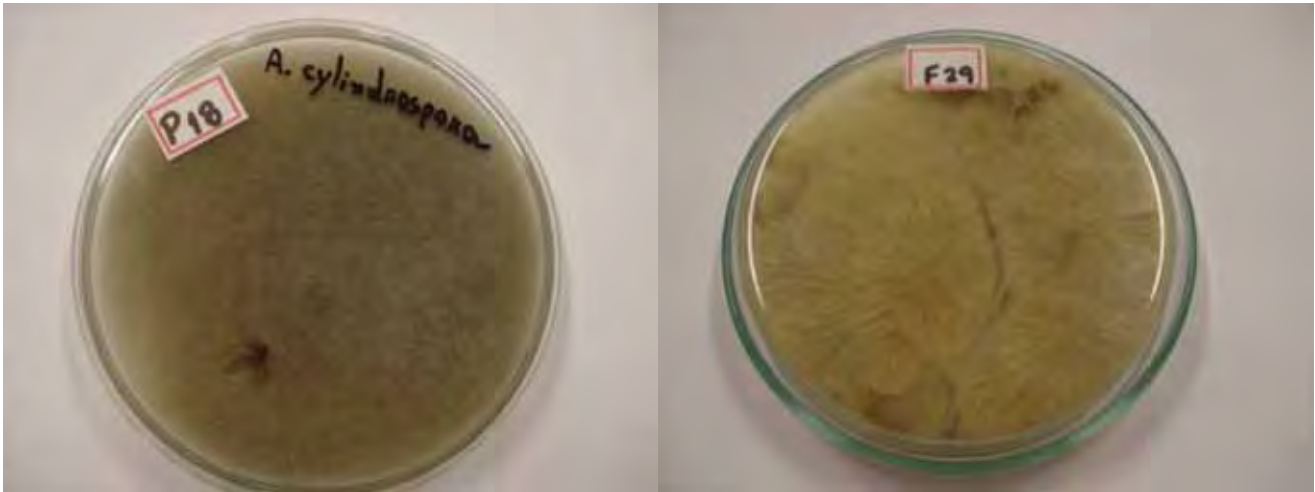
APÊNDICE 1B – Características macro e microscópicas dos gêneros isolados.

Gênero: *Absidia*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio hialino depois torna-se cinza.• Abundante micélio aéreo.• Reverso incolor e aspecto rugoso.	<ul style="list-style-type: none">• Hifas não septadas.• Esporangióforo tem apófise.• Esporangióforo não pigmentado.

FRENTE

VERSO

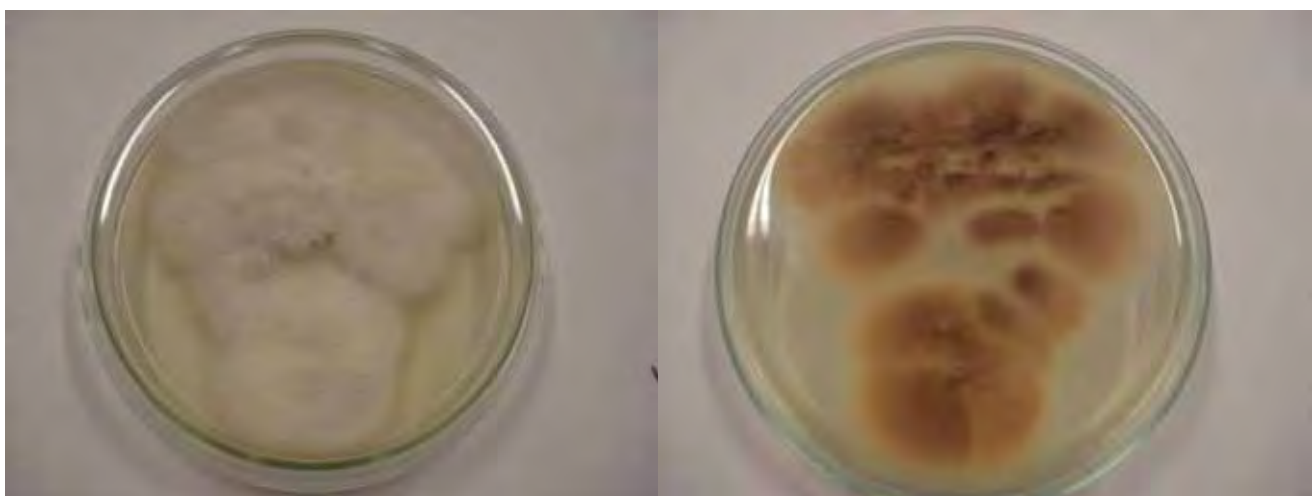


Gênero: *Acremonium*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio hialino, moderadamente aéreo.• Reverso de cor rosa-roxo e liso.	<ul style="list-style-type: none">• Fiálides solitárias ou ramificadas originadas do feixe de hifas.• Conídios cilíndricos de parede lisa, sem esporos.

FRENTE

VERSO

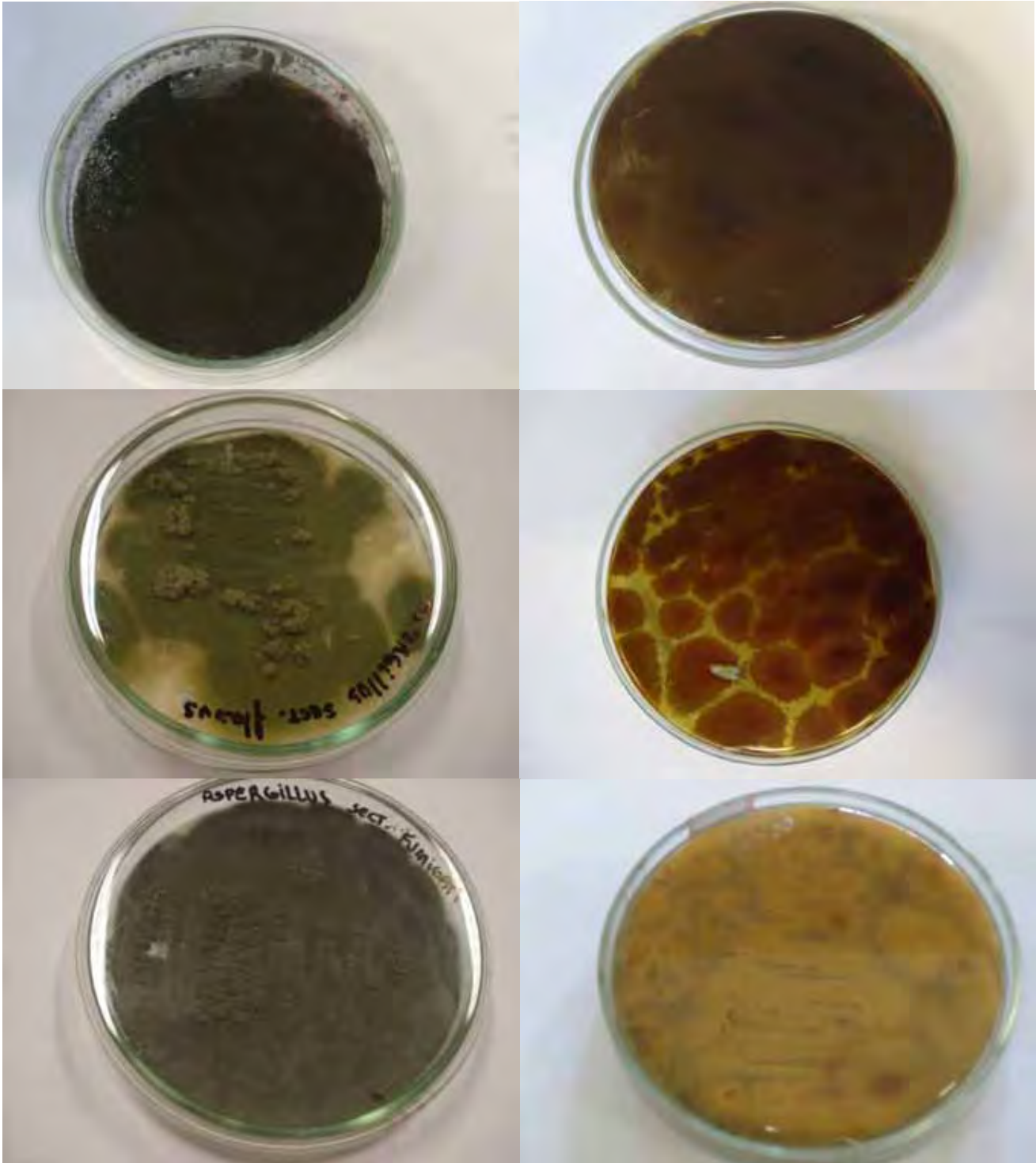


Gênero: *Aspergillus*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Colônia de coloração preta (sect nigri), amarelo escuro (sect flavus) e cinza (sect fumigati).• Micélio aéreo (sect nigri e flavus).• Micélio moderadamente aéreo (sect fumigati).	<ul style="list-style-type: none">• Esporo rugoso (sect nigri).• Hifas com vesículas terminais, recobertas de fiálides (sect flavus).• Esporos saem da fiálide em cadeias (sect flavus).• Esporos colunares, crescendo somente no topo da vesícula (sect flavus).

FRENTE

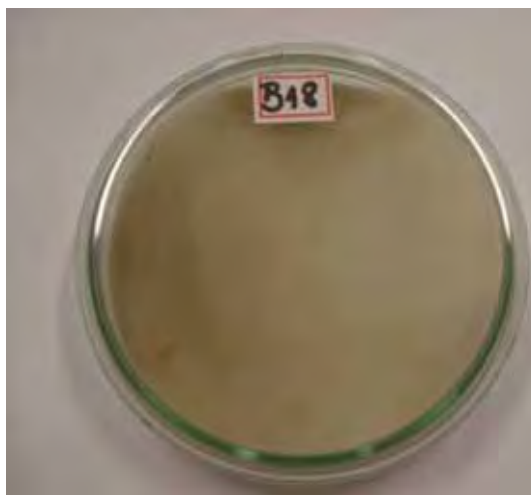
VERSO



Gênero: *Cunninghamella*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio hialino.• Abundante micélio aéreo.• Reverso incolor e liso.	<ul style="list-style-type: none">• Hifas não septadas.• Esporos esféricos de parede lisa a levemente espinhosa.• Esporangióforo ramificado (em vértice).• Formação de vesículas com esporos em volta (esporos rugosos).

FRENTE



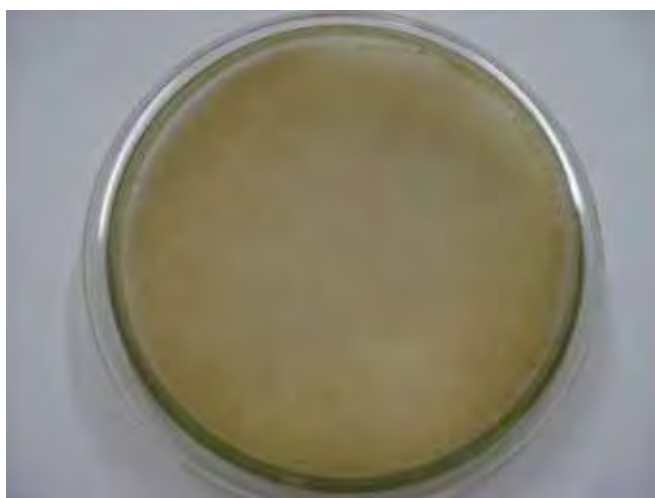
VERSO



Gênero: *Mucor*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio amarelado.• Abundante micélio aéreo.• Reverso liso e amarelado.	<ul style="list-style-type: none">• Esporos cilíndricos de parede lisa.• Hifa levemente escura.

FRENTE



VERSO

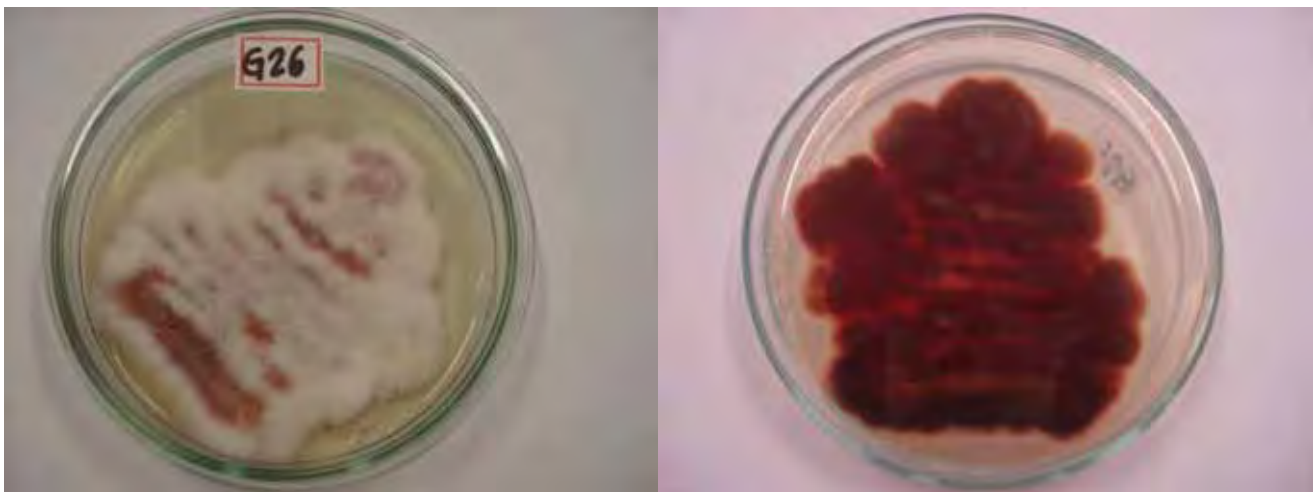


Gênero: *Fusarium*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio amarelado.• Abundante micélio aéreo.• Reverso liso e amarelado.	<ul style="list-style-type: none">• Esporos cilíndricos de parede lisa.• Hifa levemente escura.

FRENTE

VERSO



Gênero: *Paecilomyces*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio denso, moderadamente aerado.• Micélio de leve coloração rósea.• Reverso liso e incolor.	<ul style="list-style-type: none">• Fiálides mais abertas, com formação de longas cadeias de esporos.• Esporos esféricos.

FRENTE



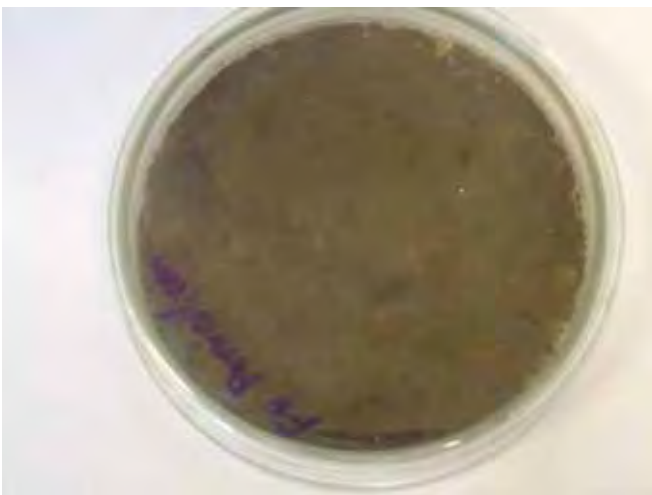
VERSO



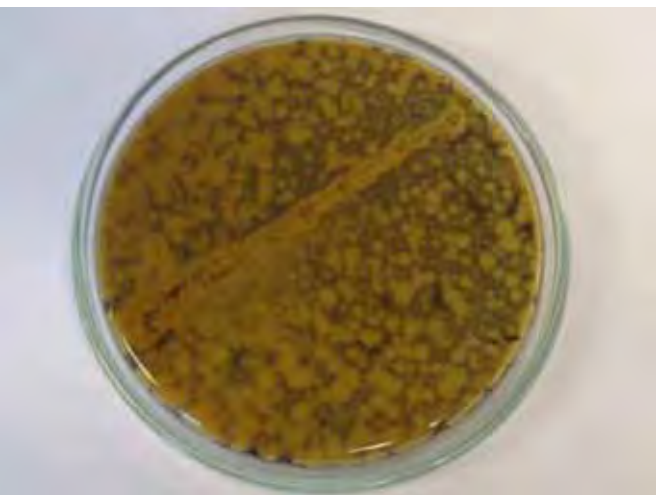
Gênero: *Penicillium*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Colônia plana (ausência de micélio aéreo).• Reverso amarelado.	<ul style="list-style-type: none">• Conidióforos em forma de vassoura.• Não apresenta vesícula.• Esporos subglobosos.

FRENTE



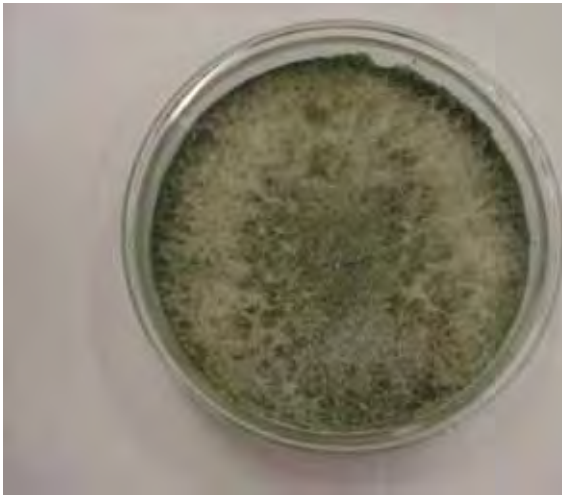
VERSO



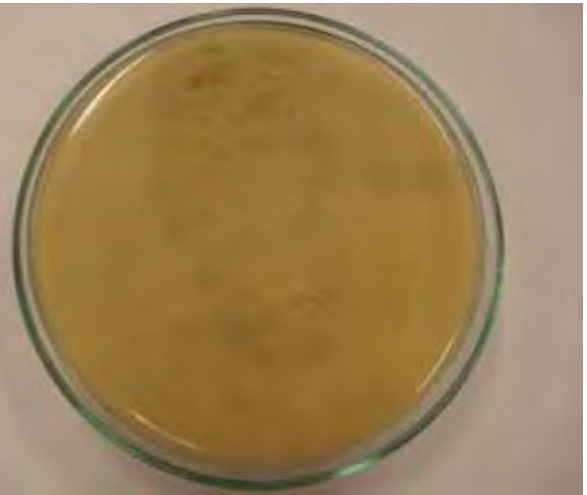
Gênero: *Trichoderma*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio hialino.• Micélio moderadamente aéreo.• Reverso incolor.• Esporos verdes.	<ul style="list-style-type: none">• Esporos cilíndricos a subsféricos, de parede lisa.• Nascem em fiálides.• Hifa septada.• Surgem em conidióforos ramificados.

FRENTE



VERSO



Gênero: *Verticillium*

Macroscopia da colônia	Microscopia da colônia
<ul style="list-style-type: none">• Micélio hialino.• Micélio moderadamente aéreo.• Reverso amarelado.	<ul style="list-style-type: none">• Produz fiálide em vértice.• Esporos subsféricos.

FRENTE



VERSO



APÊNDICE 2 – Identificação dos isolados de solo de plantação de cana de açúcar.

Tabela 14: Identificação dos isolados.

COLETA	MEIO	FRASCO	SOLO	FUNGO	GÊNERO	ESPÉCIE				
1	Glicose	1	Queima	G01	<i>Cunninghamella</i>	sp1				
				G02	<i>Fusarium</i>	sp4				
				G03	<i>Trichoderma</i>	sp1				
				G04	<i>Trichoderma</i>	sp2				
	Farelo	2	Palha	Queima	G06	<i>Trichoderma</i>	sp1			
					F01	<i>Fusarium</i>	sp1			
		3	Palha	Queima	F02	<i>Trichoderma</i>	sp1			
					F03	<i>Trichoderma</i>	sp1			
					Bagaço	5	Queima	B01	<i>Trichoderma</i>	sp1
								B02	<i>Fusarium</i>	sp1
	6	Palha	Queima	B03	<i>Trichoderma</i>					
				B04	<i>Trichoderma</i>	sp1				
Papel				7	Queima	P01	<i>Trichoderma</i>	sp1		
						P02	<i>Fusarium</i>	sp1		
8	Palha	Queima	P03	<i>Mucor</i>	hiemalis					
2	Glicose	9	Queima	G08	<i>Aspergillus</i>	sect nigri				
				G10	<i>Cunninghamella</i>	elegans				
				G13	<i>Trichoderma</i>	sp2				
				10	Palha	Queima	G14	<i>Cunninghamella</i>	sp1	
							G15	<i>Trichoderma</i>	sp1	
							G17	<i>Trichoderma</i>	sp2	
	Farelo	11	Palha	Queima	F04	<i>Verticillium</i>	sp			
					F06	<i>Trichoderma</i>	sp1			
					F07	<i>Paecilomyces</i>	sp			
					F08	<i>Penicillium</i>	sp			
					F10	<i>Fusarium</i>	sp6			
					F12	<i>Aspergillus</i>	sect flavus			
					12	Palha	Queima	F13	<i>Fusarium</i>	sp5
								F16	<i>Cunninghamella</i>	sp2
	Bagaço	13	Palha	Queima	F18	<i>Aspergillus</i>	sect fumigati			
					B05	<i>Trichoderma</i>				
					B06	<i>Cunninghamella</i>	elegans			
					B07	<i>Aspergillus</i>	sect flavus			
					14	Palha	Queima	B13	<i>Trichoderma</i>	sp1
								B16	<i>Cunninghamella</i>	sp2
Papel								15	Palha	Queima
	P07	<i>Paecilomyces</i>	sp							
	P08	<i>Cunninghamella</i>	sp1							
	16	Palha	Queima	P14	<i>Trichoderma</i>	sp1				
P18				<i>Absidia</i>	cylindrospora					
3	Glicose	17	Palha	Queima	G19	<i>Trichoderma</i>	sp1			
					G20	*F.N.I.	--			
					G21	<i>Trichoderma</i>	sp1			

COLETA	MEIO	FRASCO	SOLO	FUNGO	GÊNERO	ESPÉCIE
	Farelo	19	Queima	G22	<i>Trichoderma</i>	sp3
				F19	<i>Cunninghamella</i>	sp1
		20	Palha	F20	<i>Trichoderma</i>	sp1
				F22	<i>Trichoderma</i>	sp1
	Bagaço	21	Queima	F24	<i>Trichoderma</i>	sp1
				B18	<i>Cunninghamella</i>	sp1
				B19	<i>Fusarium</i>	sp1
				B20	<i>Aspergillus</i>	sect flavus
		22	Palha	B21	<i>Aspergillus</i>	sect nigri
				B22	<i>Mucor</i>	hiemalis
	Papel	23	Queima	B23	<i>Trichoderma</i>	sp1
				P19	<i>Trichoderma</i>	sp1
		24	Palha	P20	<i>Trichoderma</i>	sp1
				P21	<i>Cunninghamella</i>	sp1
4	Glicose	25	Queima	P22	<i>Aspergillus</i>	sect flavus
				G23	<i>Mucor</i>	hiemalis
				G24	<i>Fusarium</i>	sp1
		26	Palha	G25	<i>Aspergillus</i>	sect flavus
				G26	<i>Fusarium</i>	sp1
				G27	<i>Mucor</i>	hiemalis
	Farelo	27	Queima	G28	<i>Trichoderma</i>	sp1
				F25	<i>Fusarium</i>	sp3
		28	Palha	F26	<i>Trichoderma</i>	sp1
				F27	<i>Absidia</i>	cylindrospora
				F28	<i>Trichoderma</i>	sect flavus
		29	Queima	B24	<i>Aspergillus</i>	sect flavus
				B25	<i>Mucor</i>	hiemalis
	B27			<i>Trichoderma</i>	sp1	
Papel	30	Palha	B26	<i>Fusarium</i>	sp2	
			P23	<i>Mucor</i>	hiemalis	
	31	Queima	P24	<i>Acremonium</i>	sp2	
			P25	*F.N.I.	--	

* F.N.I: Fungo não identificado

APÊNDICE 3A – Atividade de xilanase dos fungos isolados.

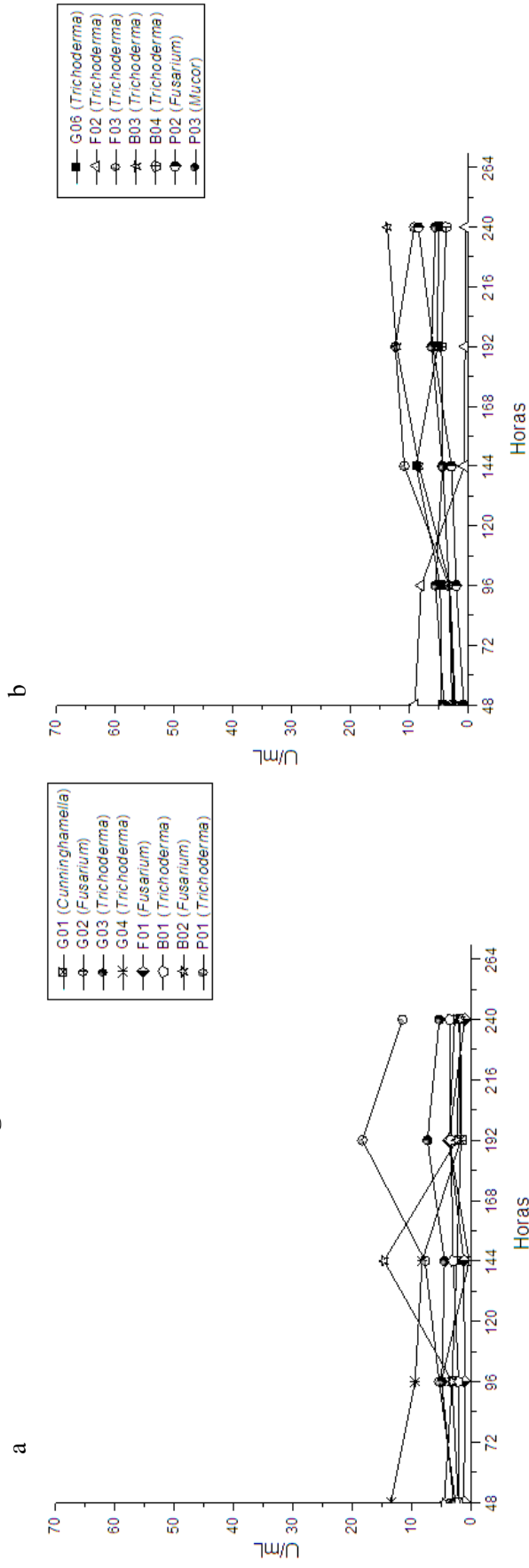


Figura 19: Produção de xilanase pelos isolados da Coleta 1: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

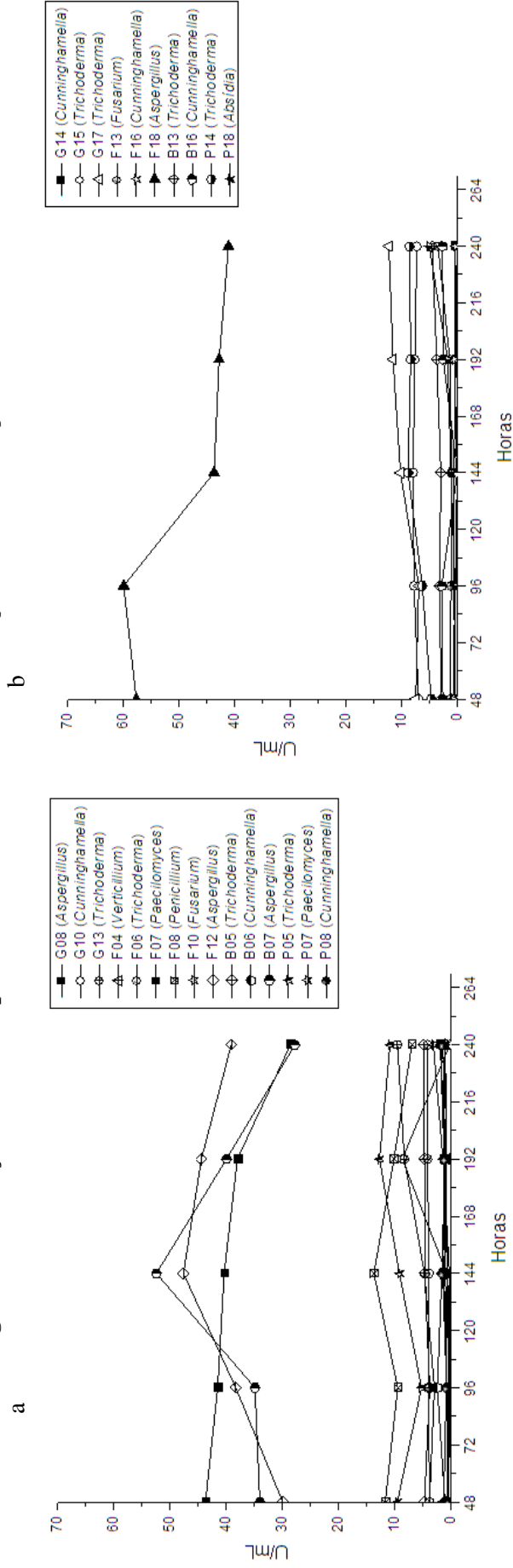


Figura 20: Produção de xilanase pelos isolados da Coleta 2: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

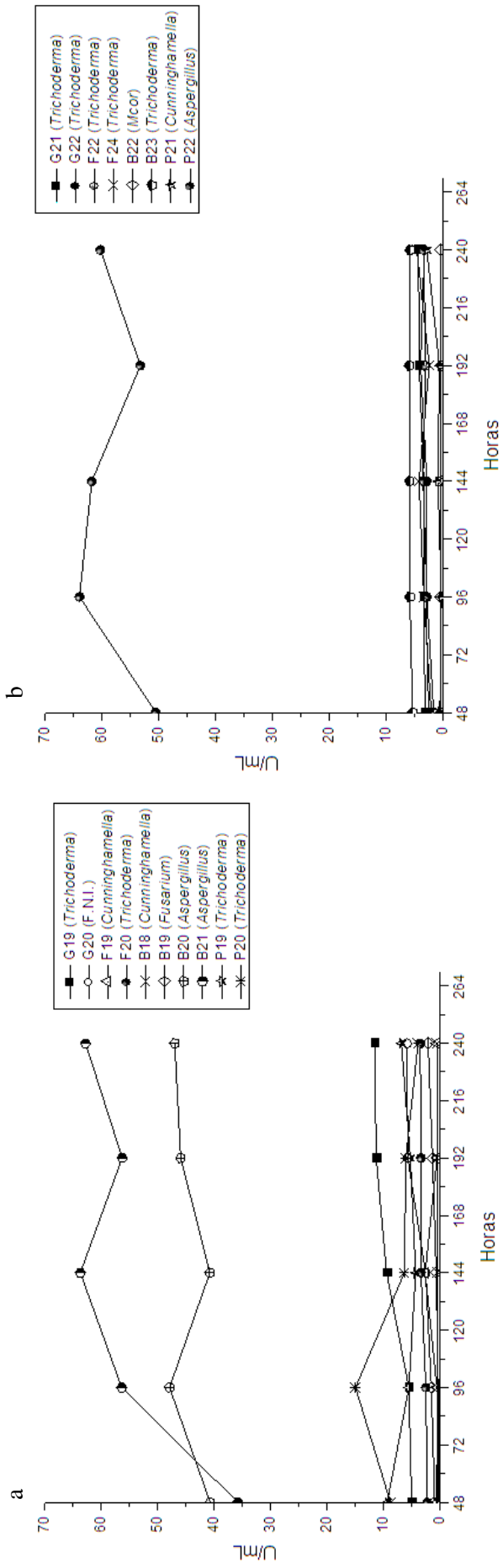


Figura 21: Produção de xilanase pelos isolados da Coleta 3: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

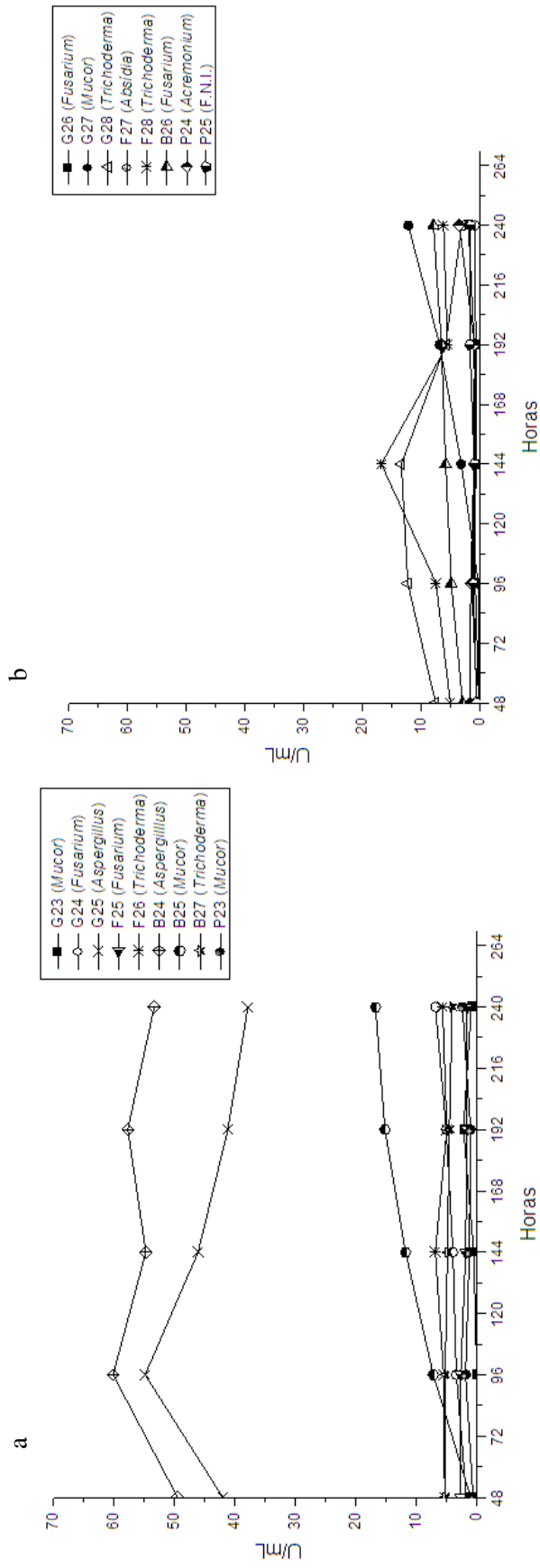


Figura 22: Produção de xilanase pelos isolados da Coleta 4: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

APÊNDICE 3B – Comparação das atividades de xilanase por coleta.

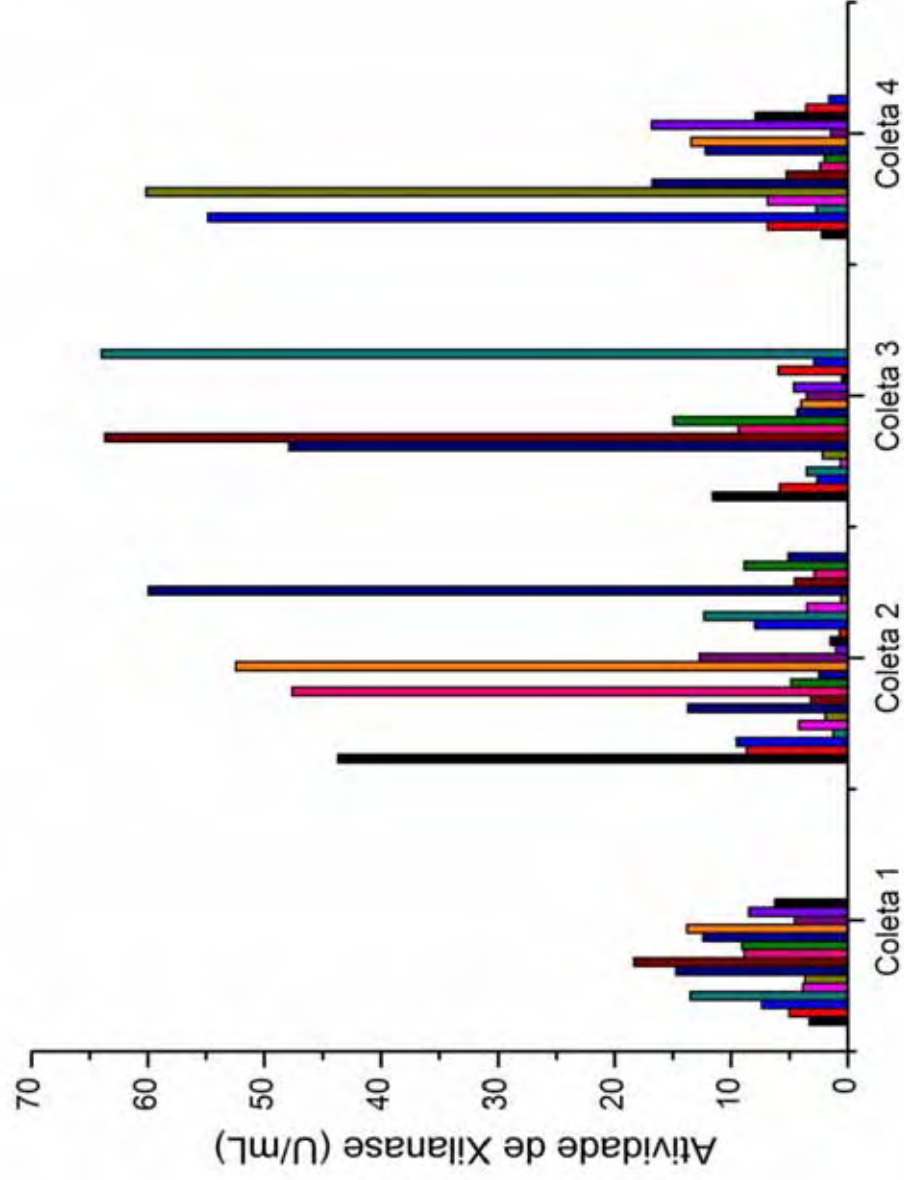


Figura 23: Produção máxima de xilanase pelos isolados, nas diferentes coletas.

APÊNDICE 4A – Atividade de CMCase dos fungos isolados.

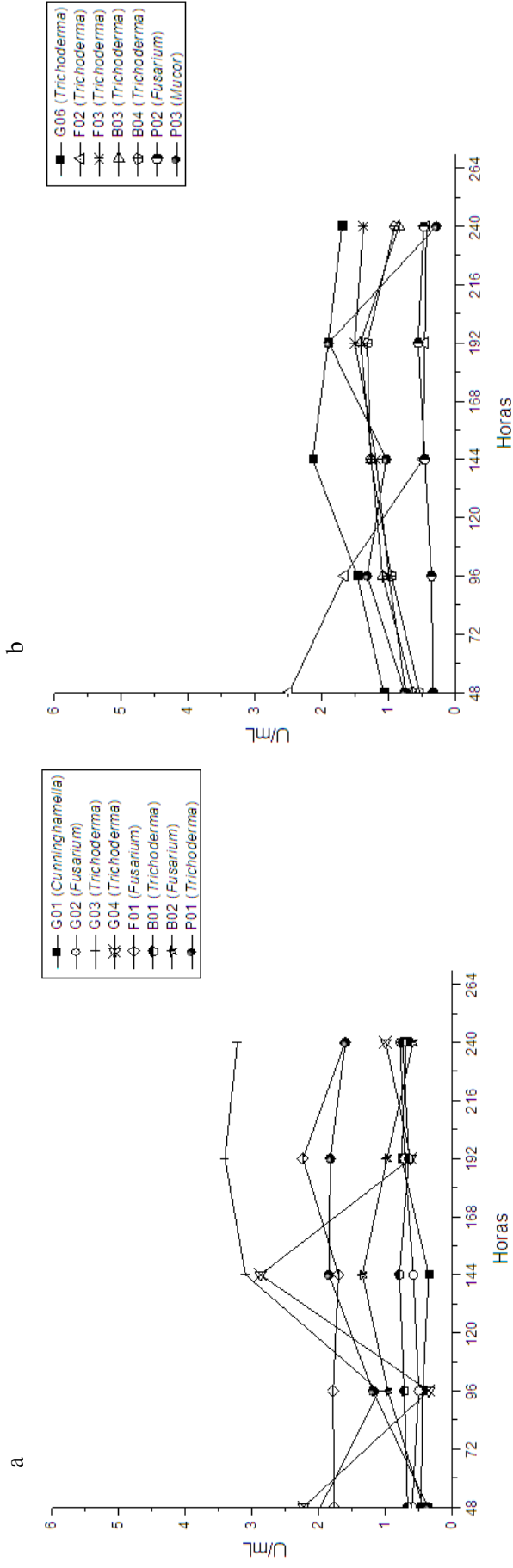


Figura 24: Produção de CMCase pelos isolados da Coleta 1: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

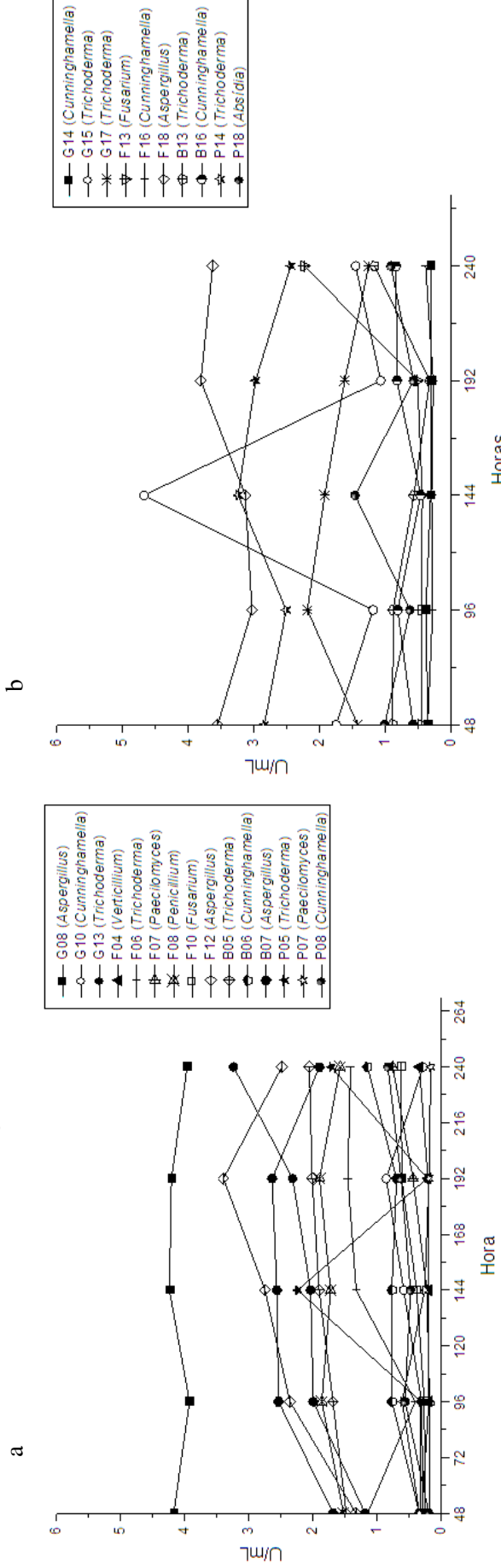


Figura 25: Produção de CMCase pelos isolados da Coleta 2: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

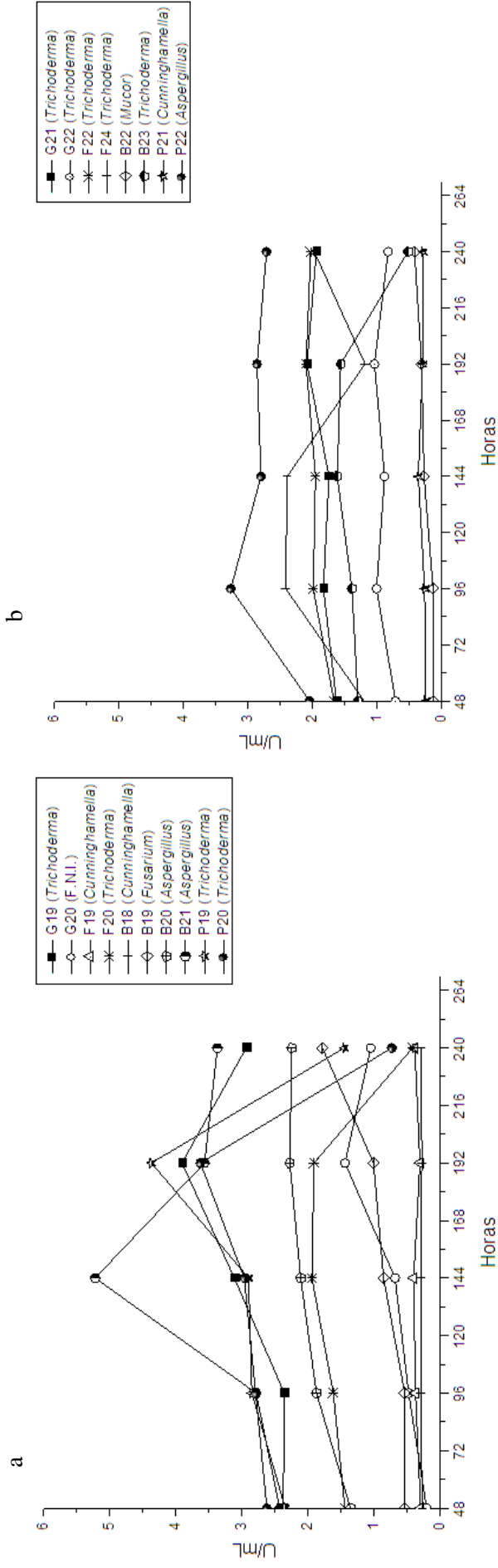


Figura 26: Produção de CMCase pelos isolados da Coleta 3: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

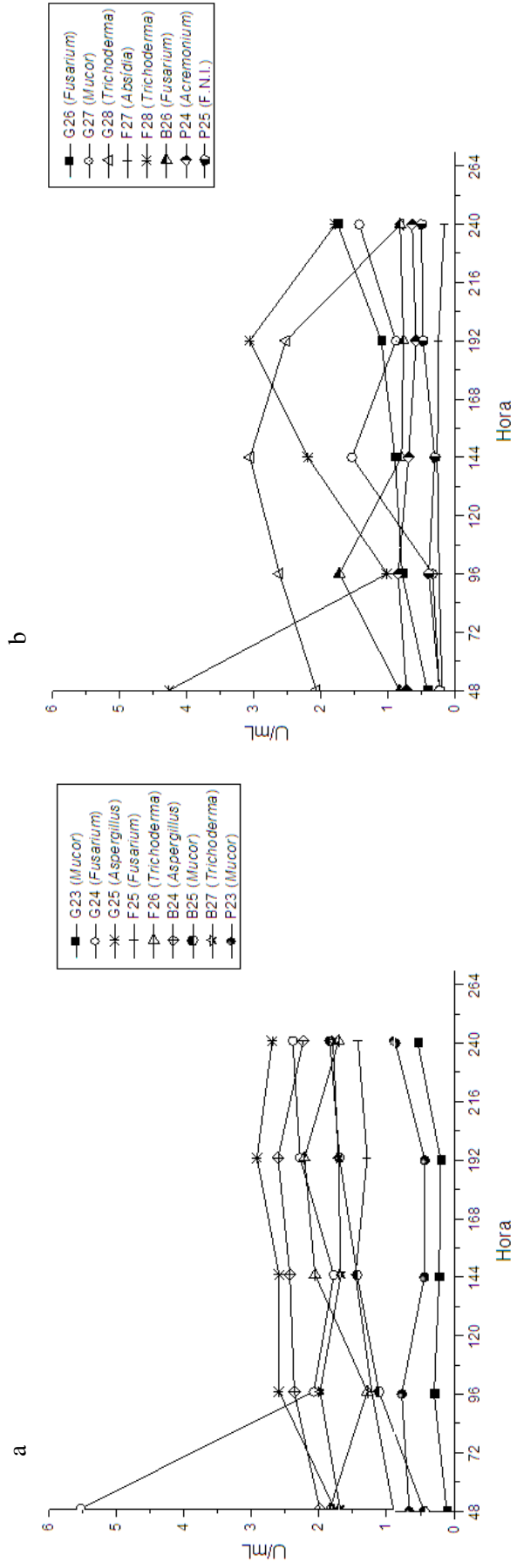


Figura 27: Produção de CMCase pelos isolados da Coleta 4: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

APÊNDICE 4B – Comparação das atividades de CMCase por coleta.

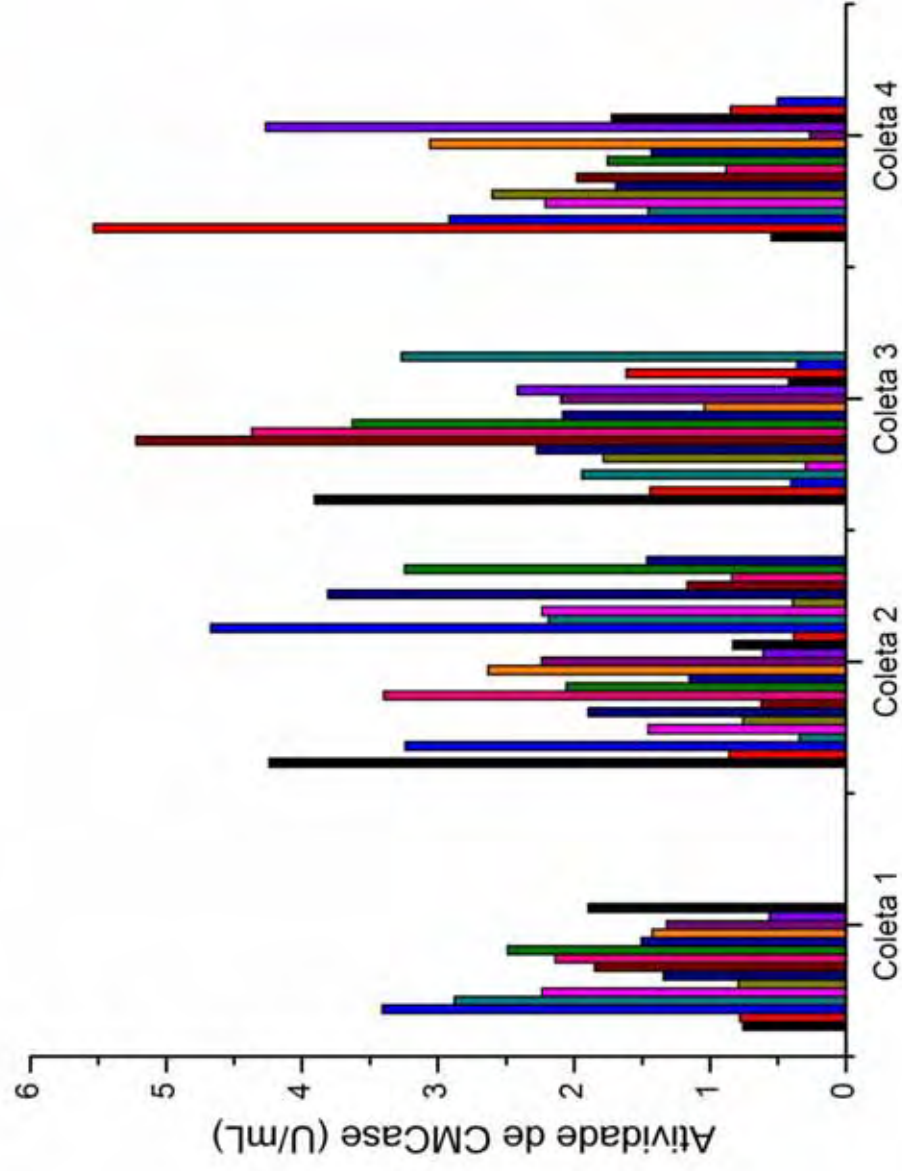


Figura 28: Produção máxima de CMCase pelos isolados, nas diferentes coletas.

APÊNDICE 5A – Atividade de lacase dos fungos isolados.

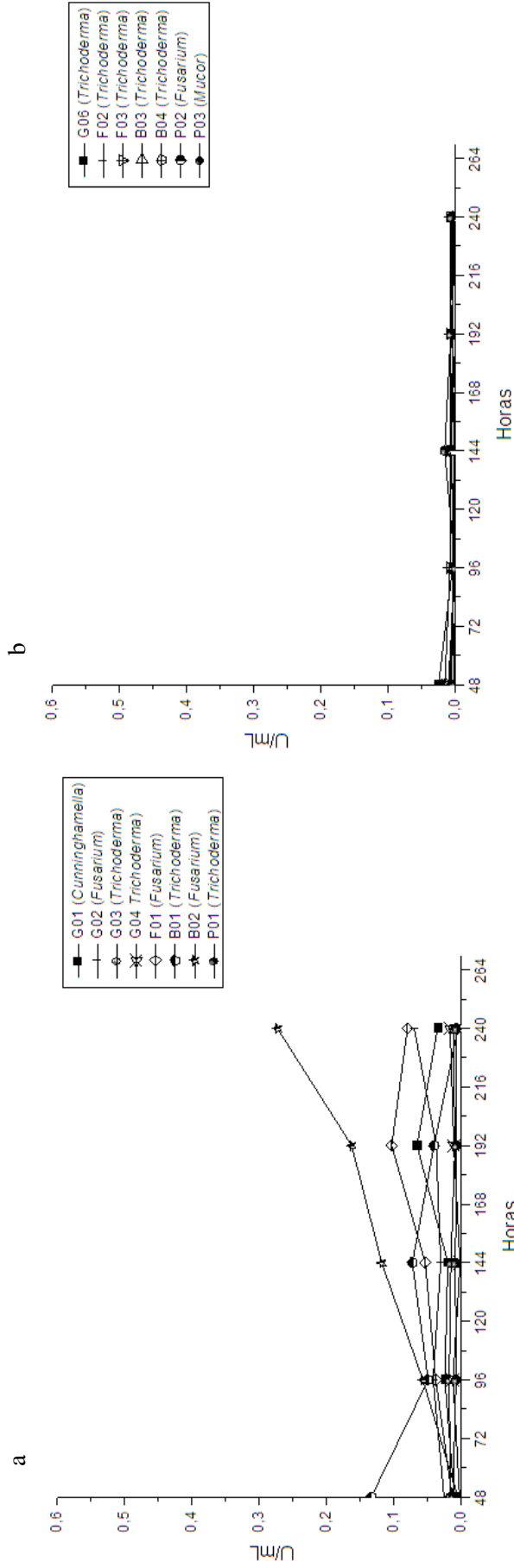


Figura 29: Produção de lacase pelos isolados da Coleta 1: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

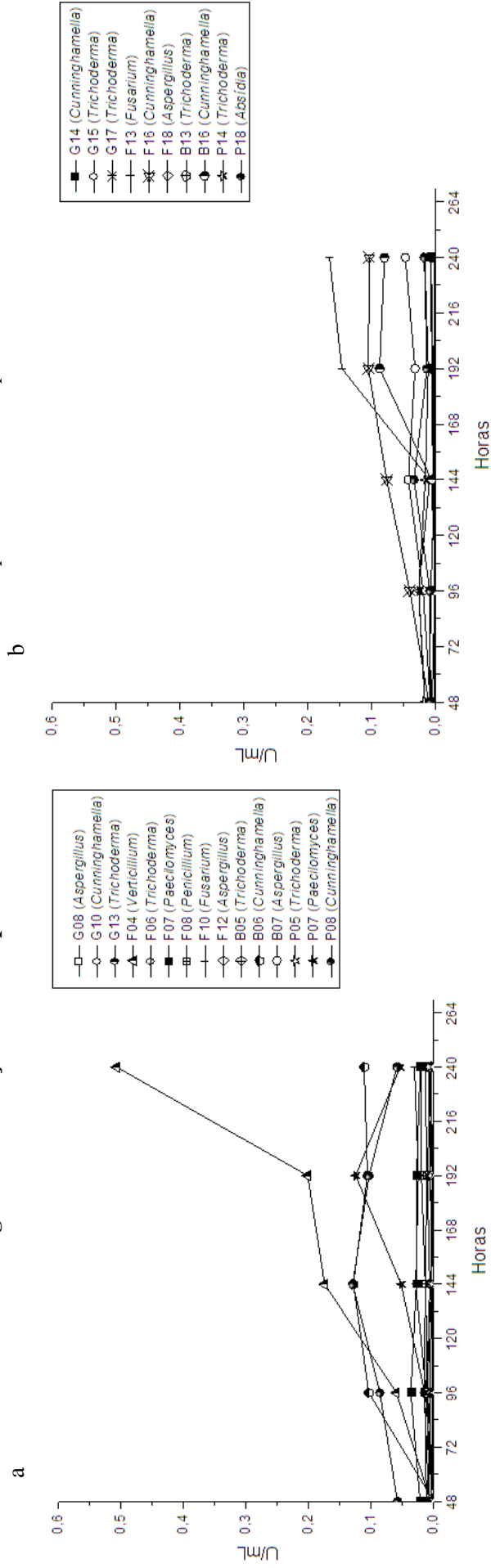


Figura 30: Produção de lacase pelos isolados da Coleta 2: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

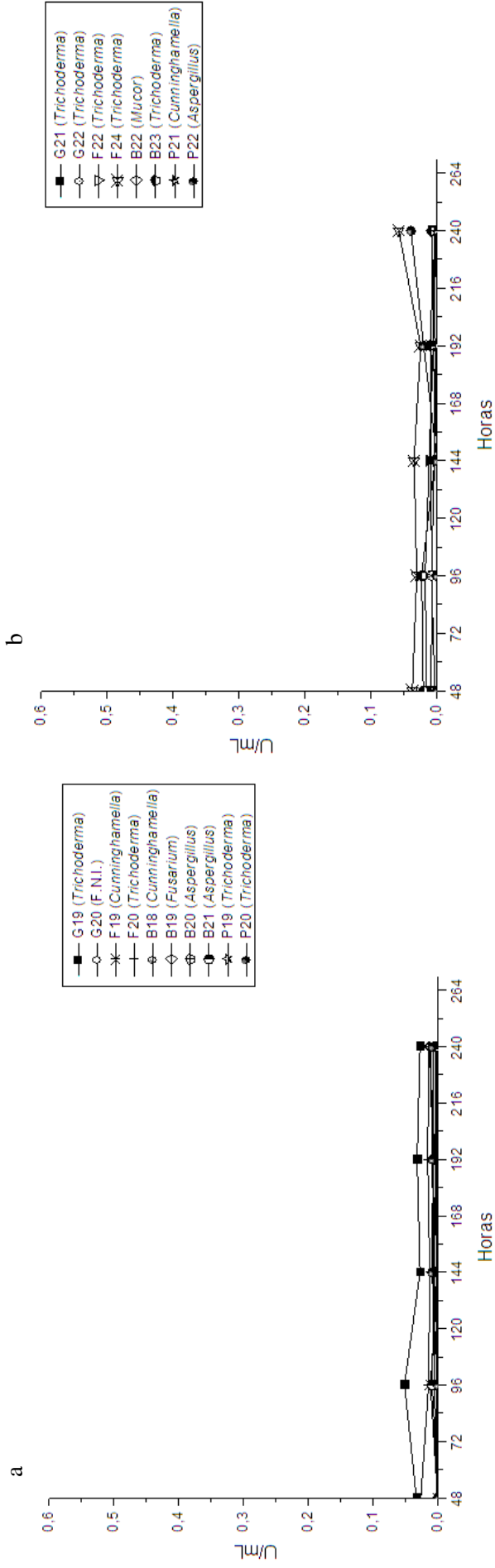


Figura 31: Produção de lacase pelos isolados da Coleta 3: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

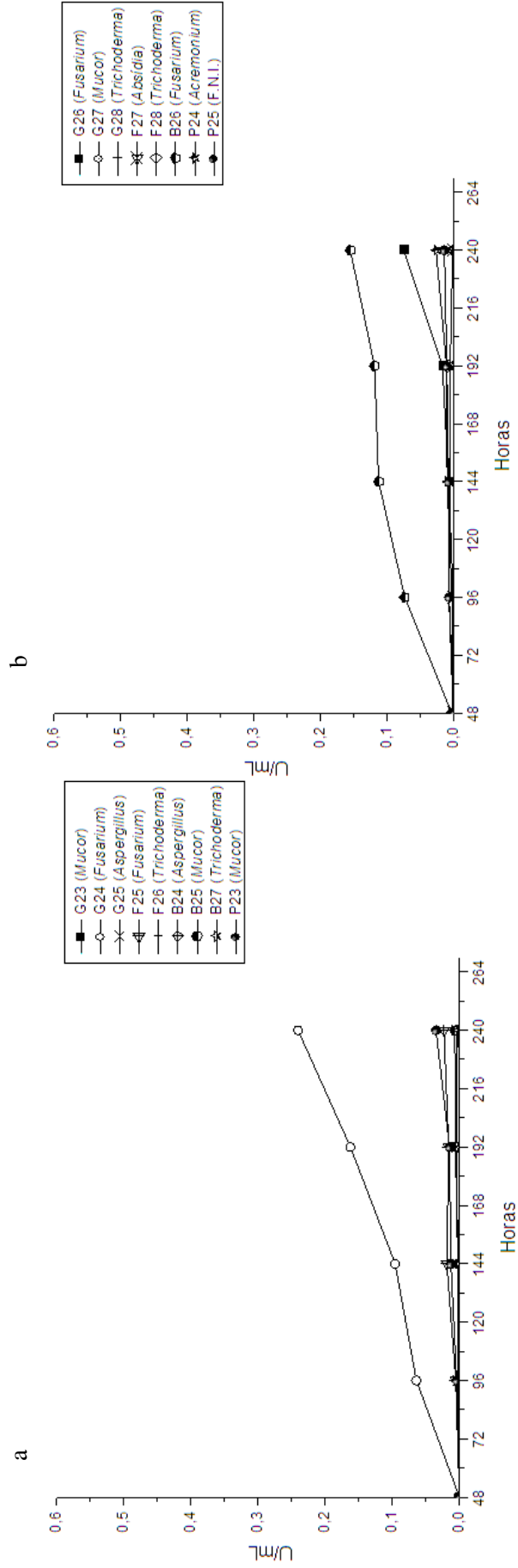


Figura 32: Produção de lacase pelos isolados da Coleta 4: a = Solo - queimada; b = Solo - palha.

APÊNDICE 5A – Atividade de lacase dos fungos isolados.

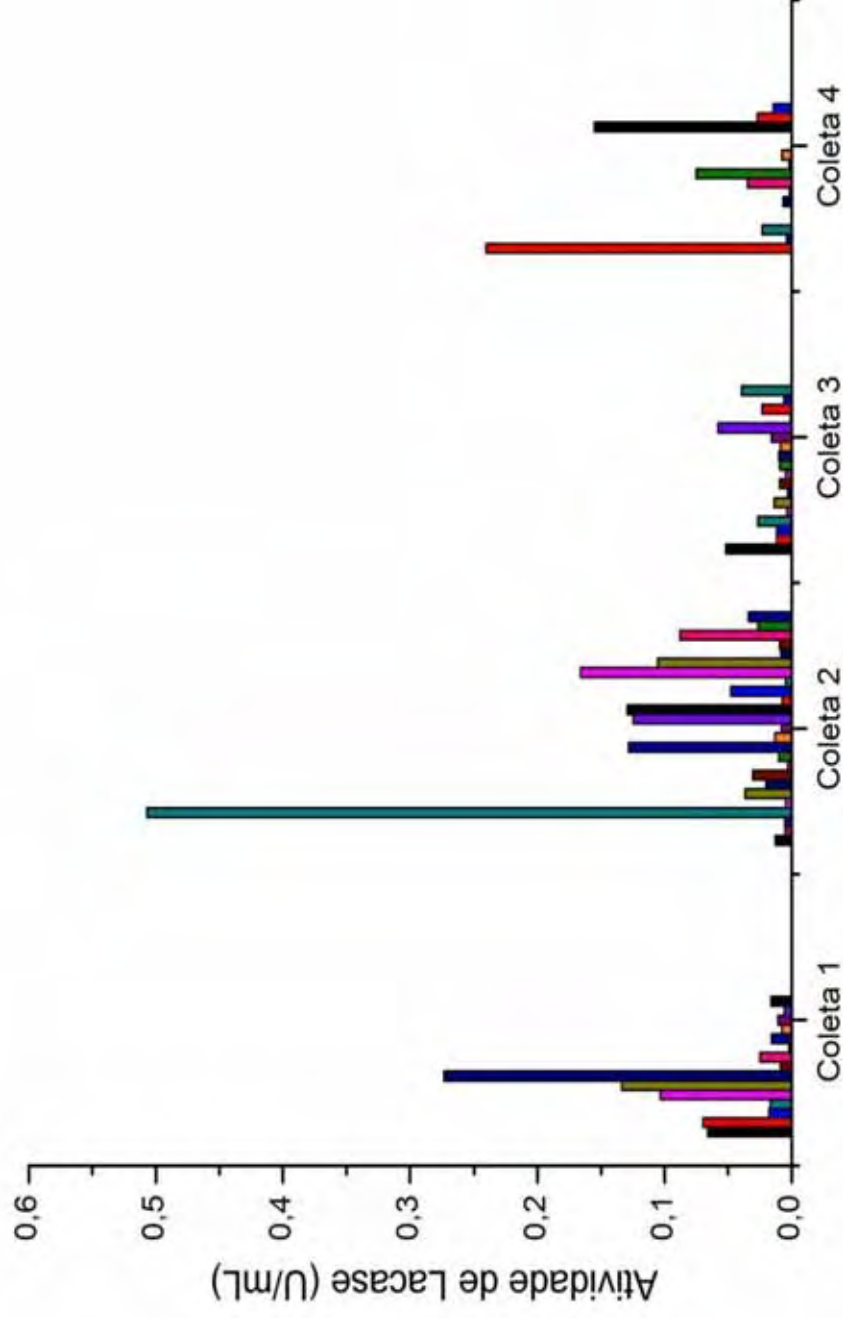


Figura 33: Produção máxima de lacase pelos isolados, nas diferentes coletas.

APÊNDICE 6 – Gráficos da degradação do herbicida diuron (com formação de pico produto e concentração) e cromatograma gerado no tempo de 168 horas de fermentação, para cada isolado testado.

As figuras abaixo mostram a comparação entre as taxas de degradação (A) e os cromatogramas gerados no tempo de 168 horas de fermentação (B) de cada isolado testado. Todos os cromatogramas tiveram tempo de corrida de 10 minutos. Neste anexo somente está demonstrado os picos formados até o tempo de 6 minutos.

Para as figuras B, tem-se:

Picos de numeração 1: Composto presente no meio de fermentação.

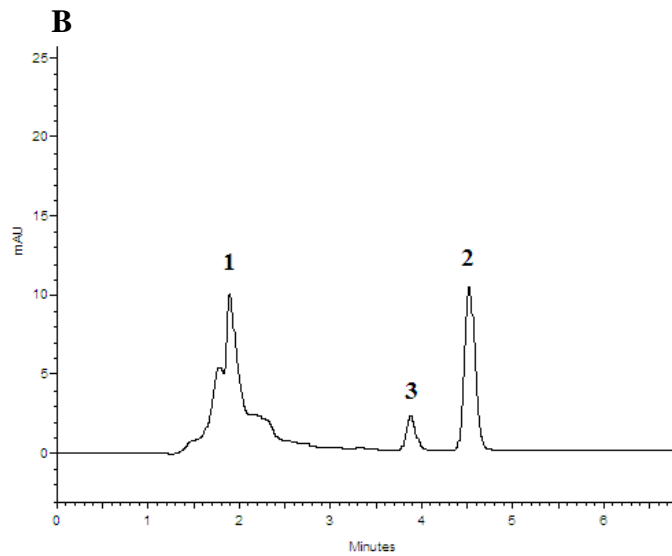
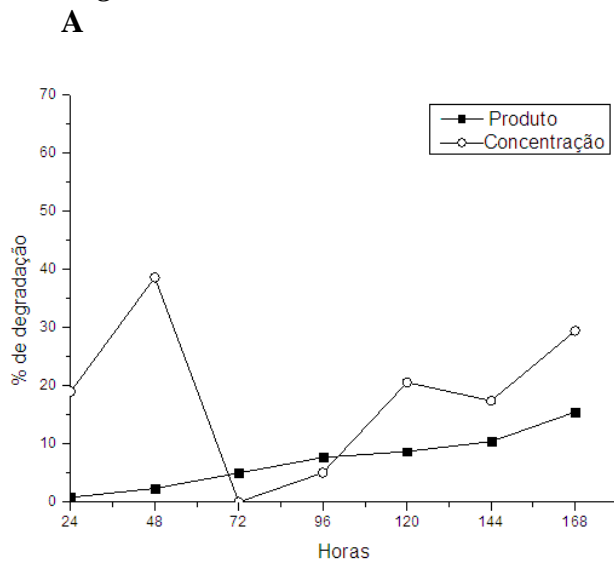
Picos de numeração 2: Diuron .

Picos de numeração 3: Pico-produto.

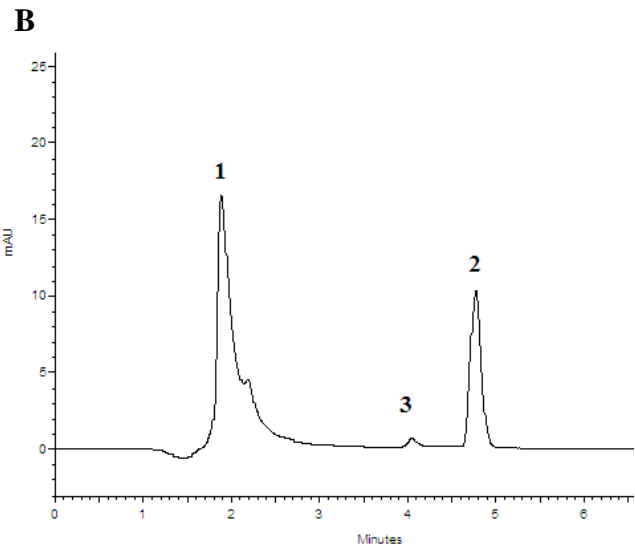
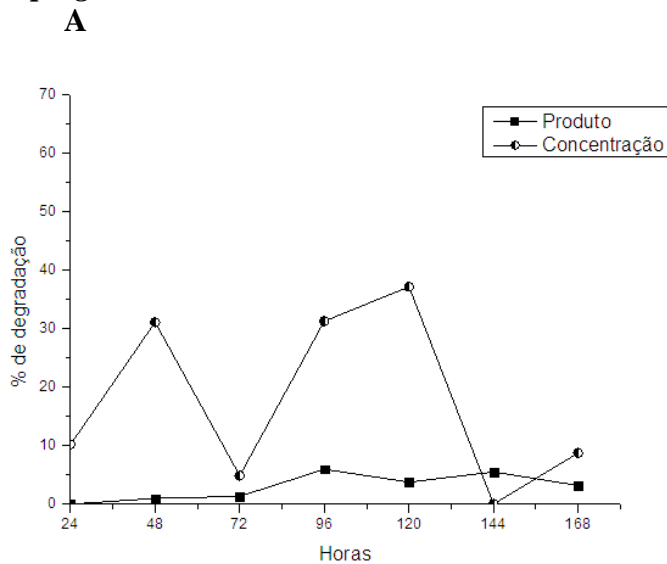
Picos de numeração 4: Produto formado no tempo de retenção de 3,1 minutos.

Picos de numeração 5: Produto formado no tempo de retenção de 5,1 minutos.

Cunninghamella - G01

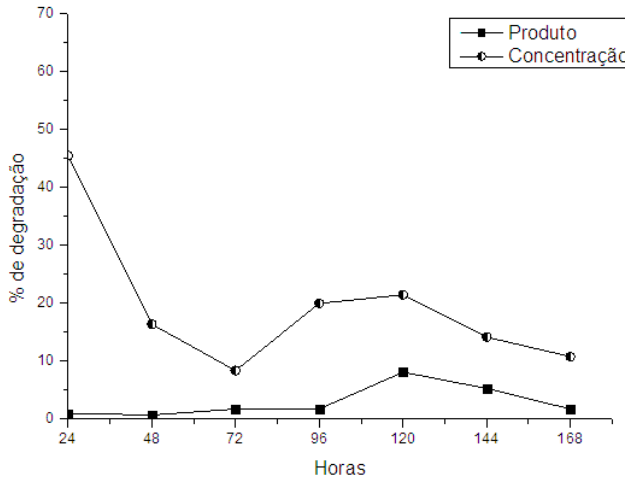


Aspergillus - G08

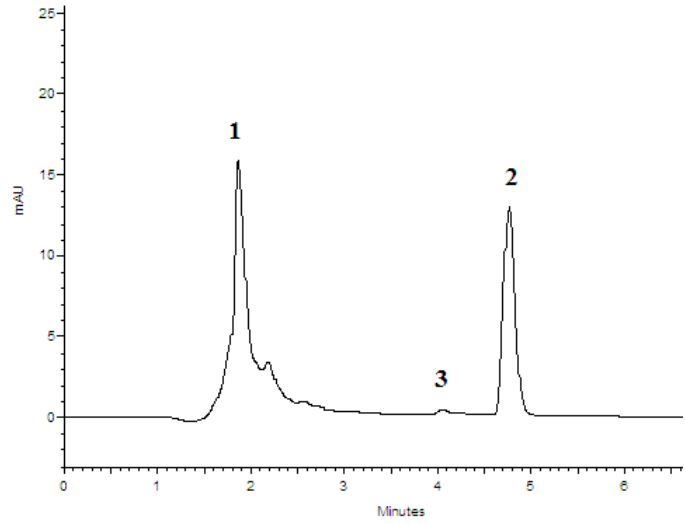


Trichoderma - G15

A

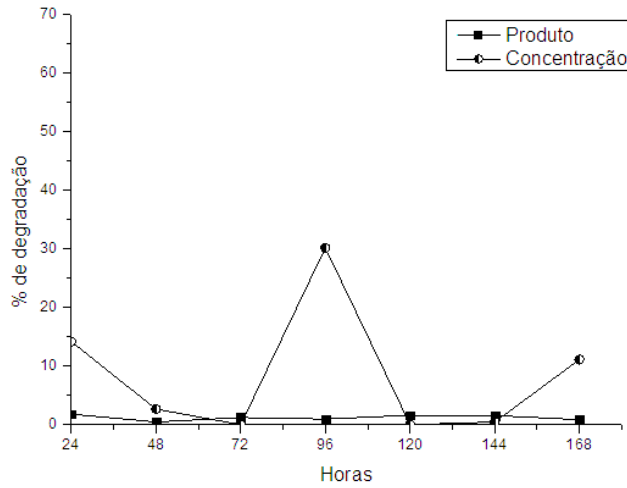


B

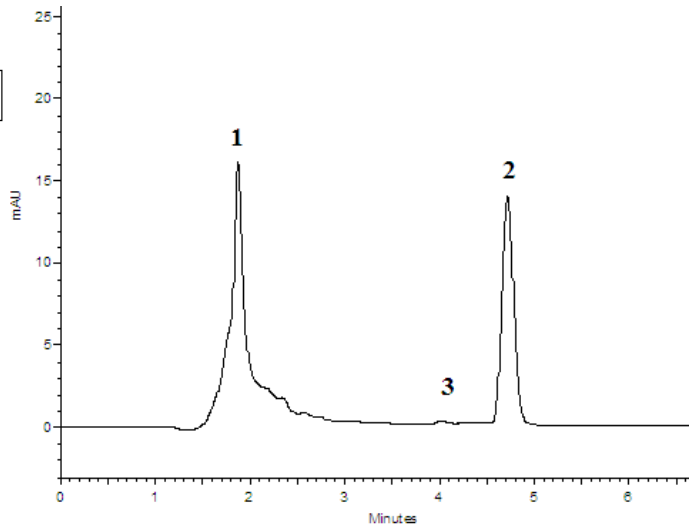


Trichoderma - G19

A

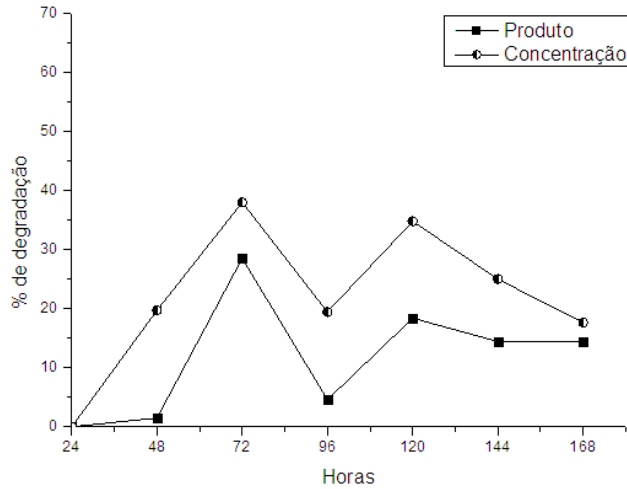


B

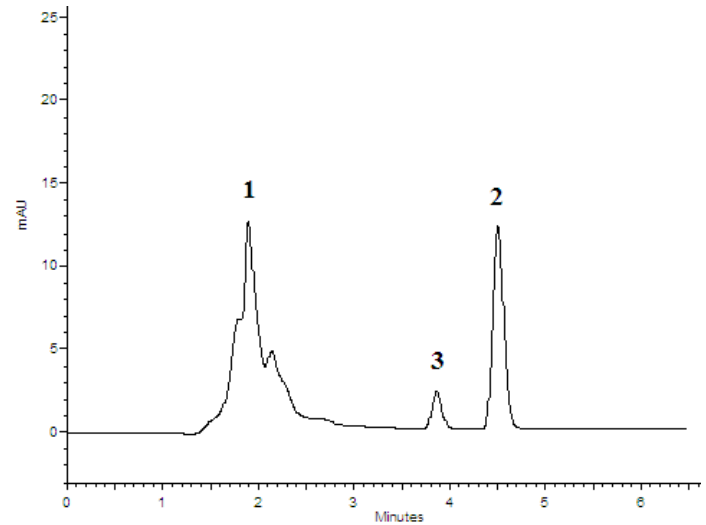


Mucor - G23

A

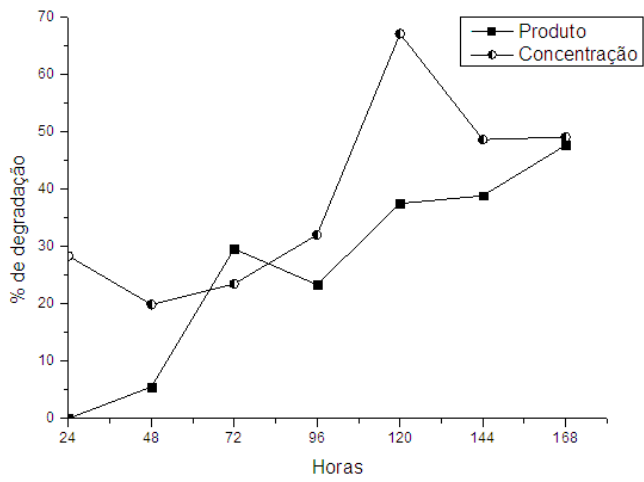


B

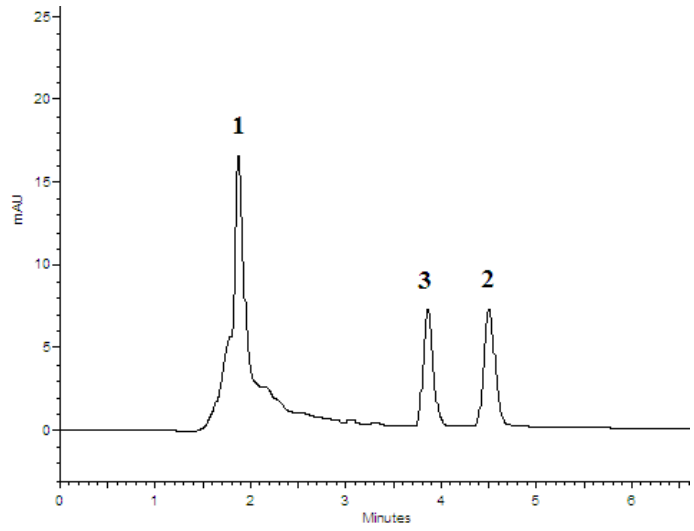


Aspergillus - G25

A

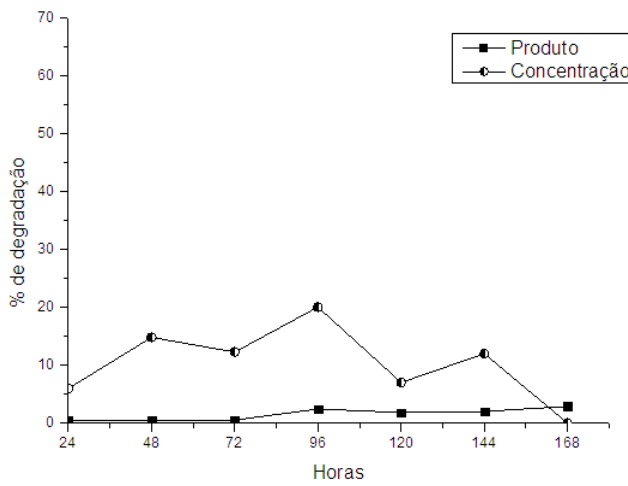


B

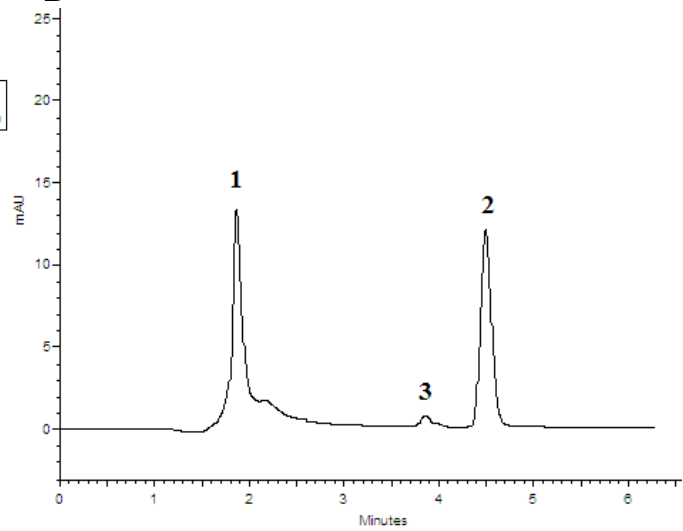


Verticillium - F04

A

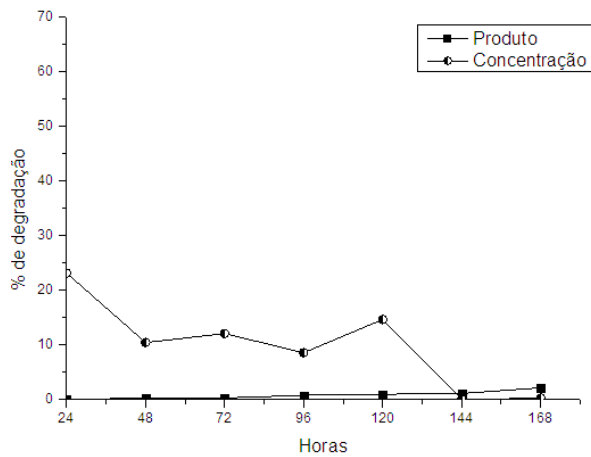


B

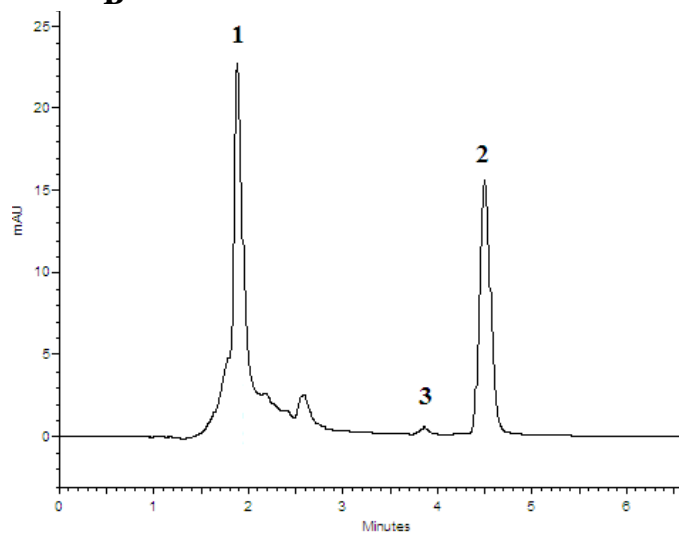


Penicillium - F08

A

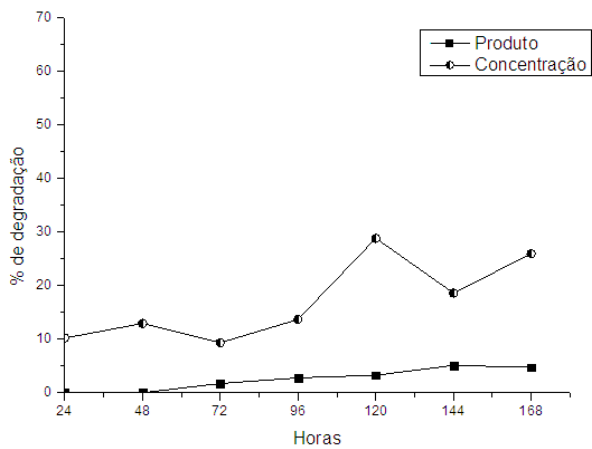


B

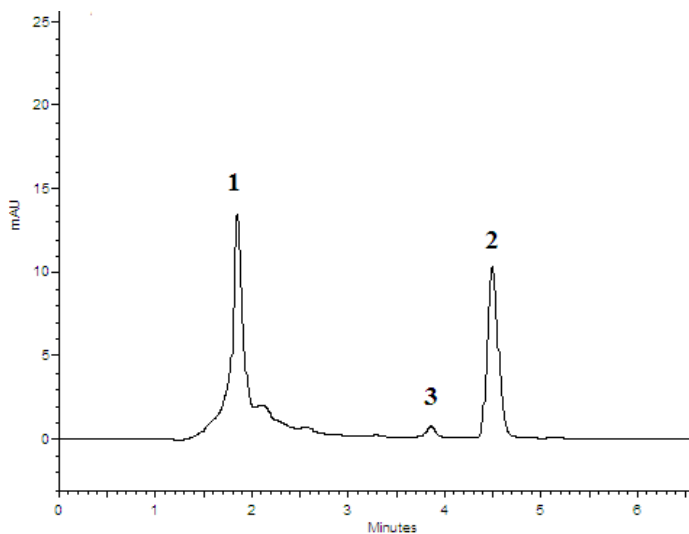


Fusarium - F13

A

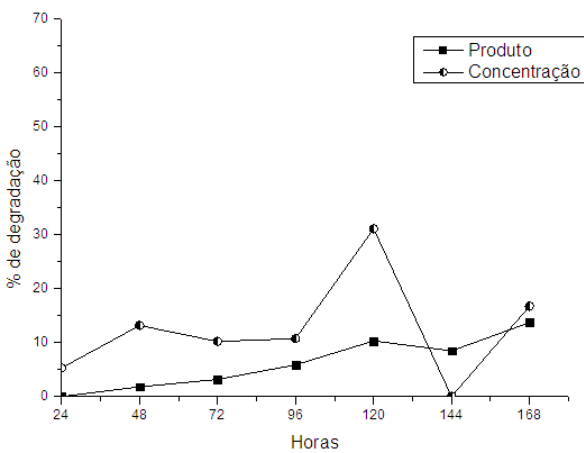


B

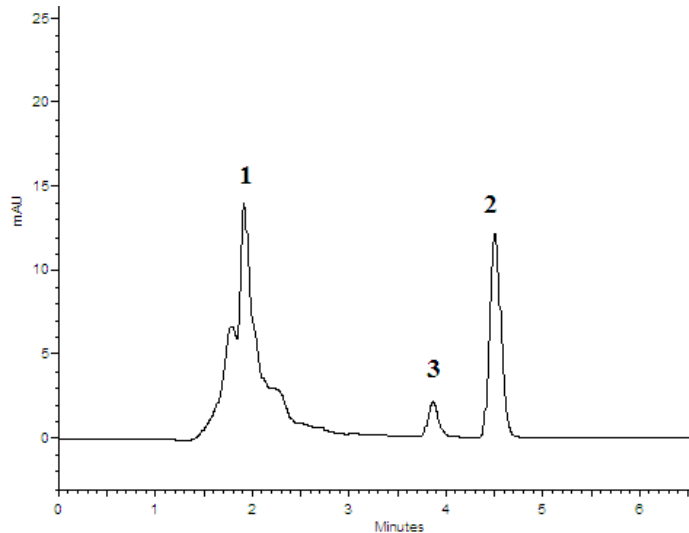


Cunninghamella - F19

A

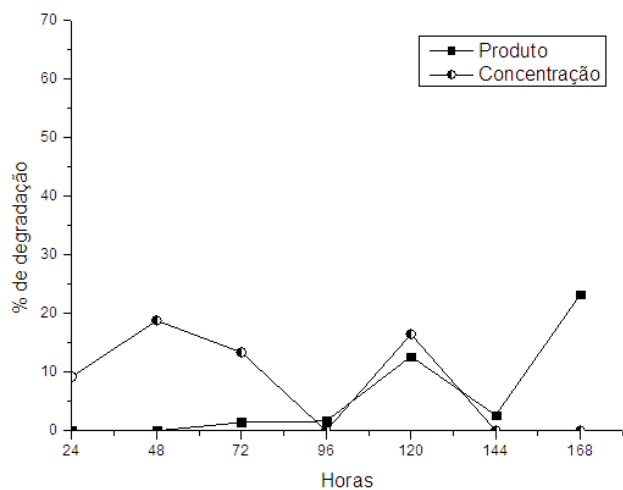


B

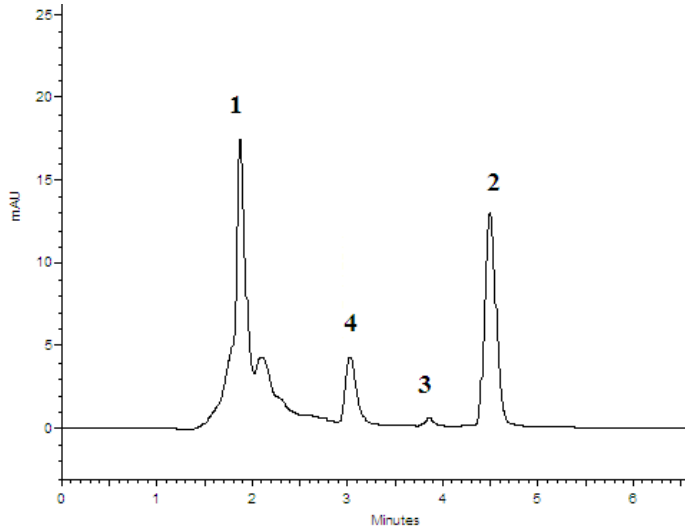


Absidia - F27

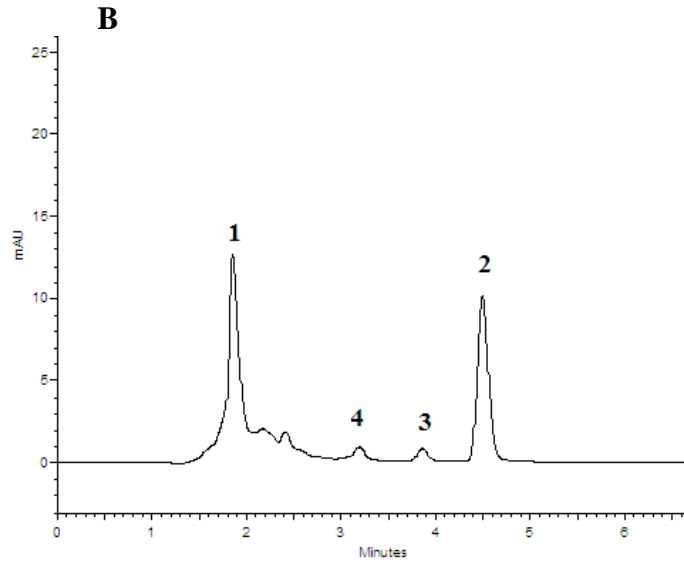
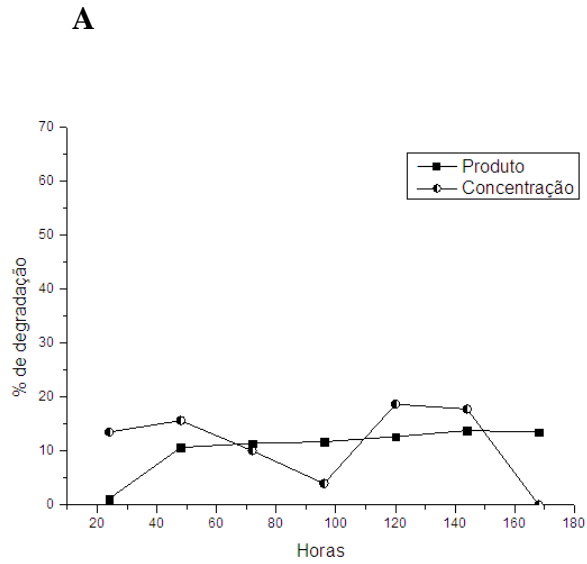
A



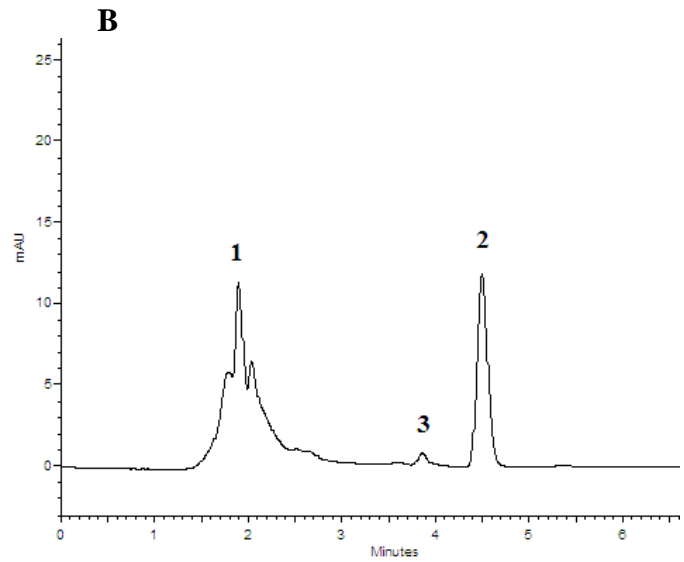
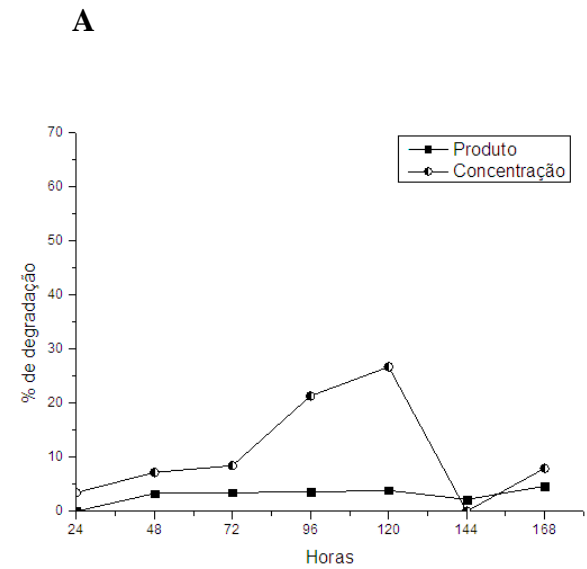
B



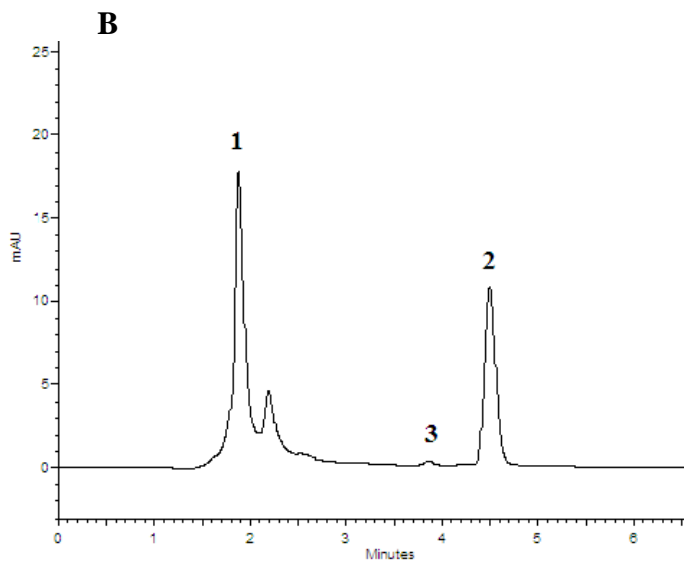
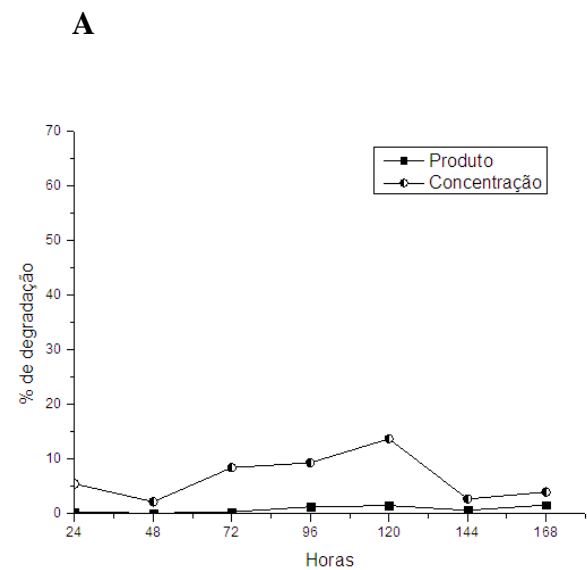
Trichoderma - F28



Trichoderma - B01

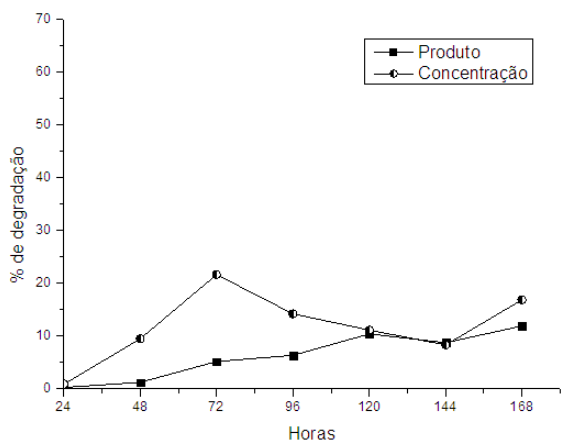


Fusarium - B02

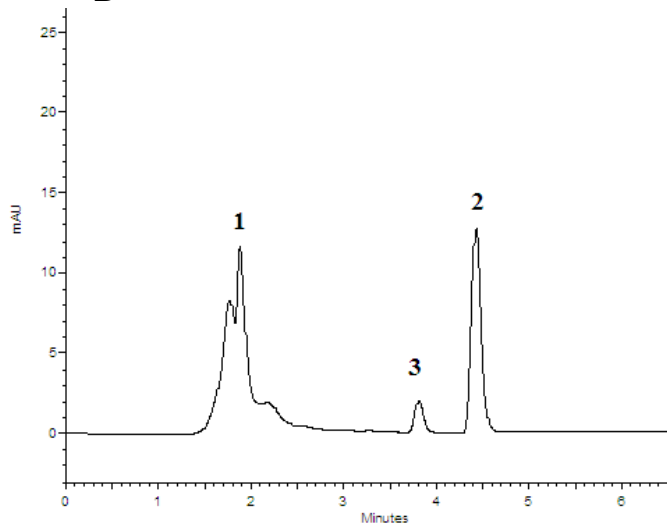


Cunninghamella - B06

A

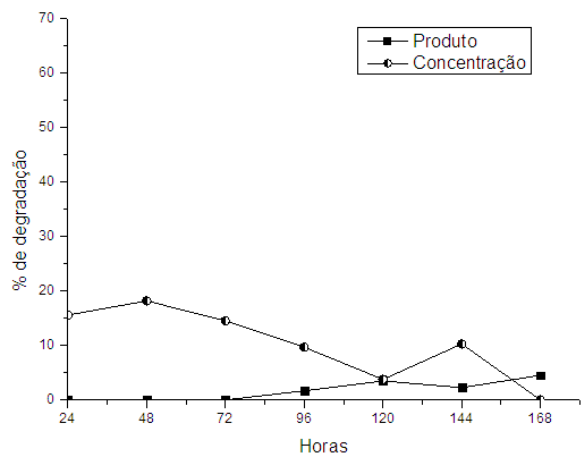


B

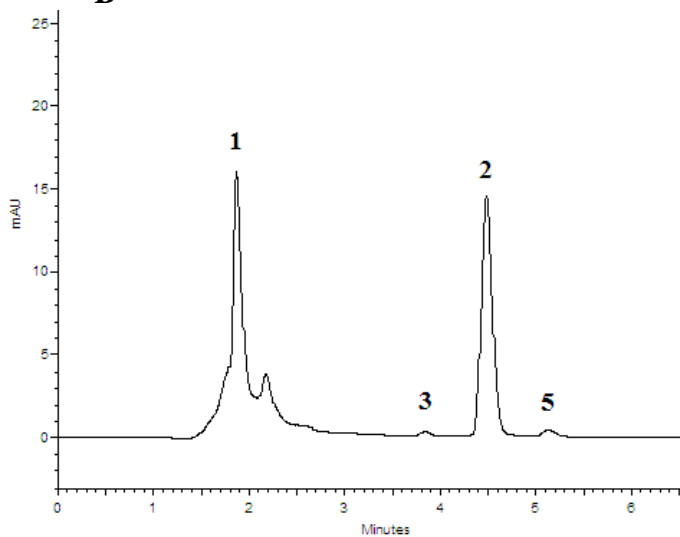


Fusarium - B19

A

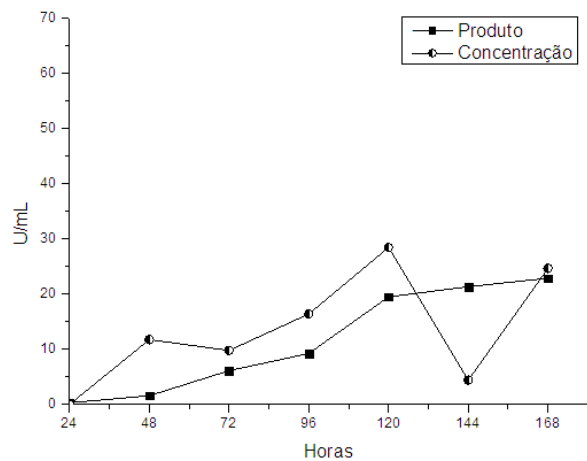


B

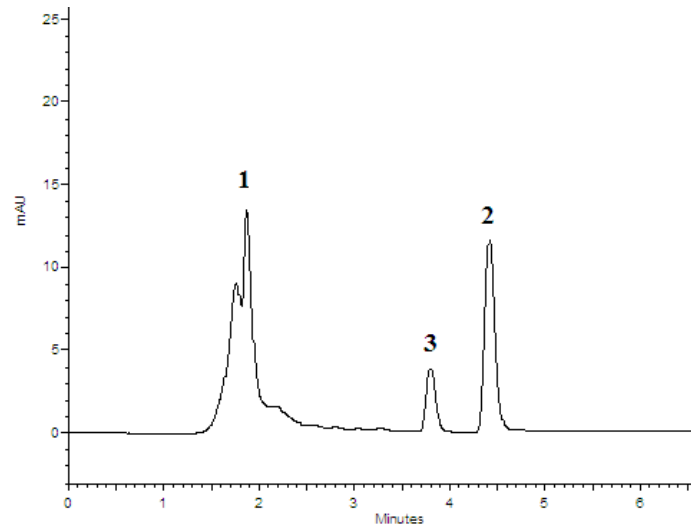


Mucor - B22

A

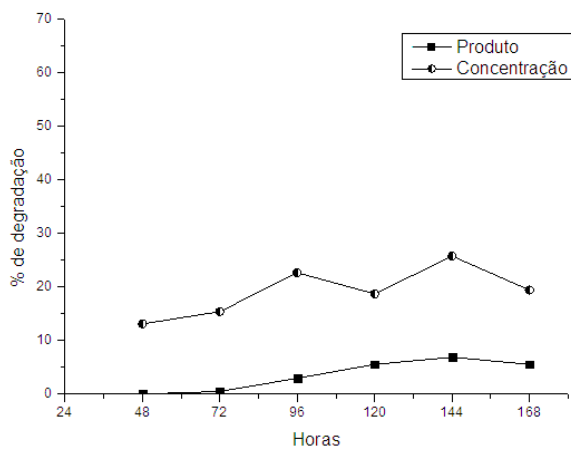


B

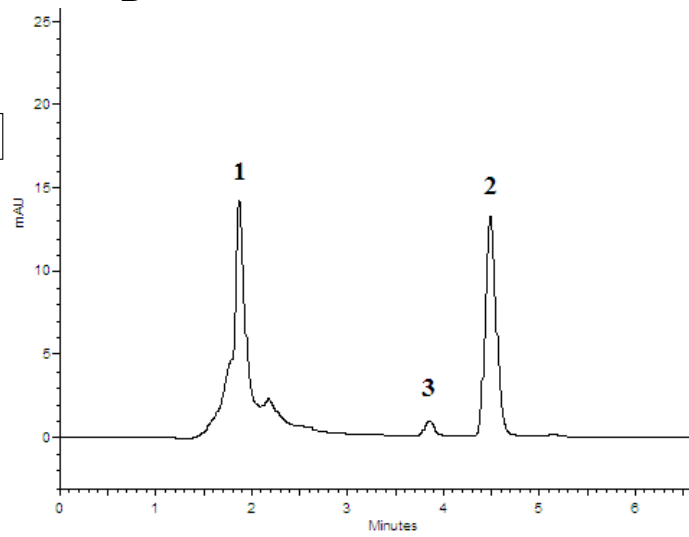


Fusarium - B26

A

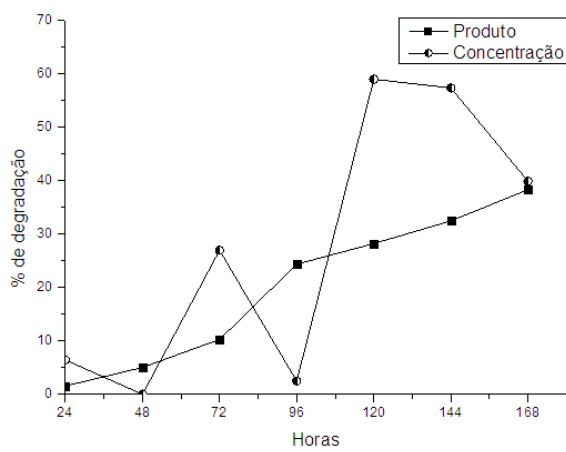


B

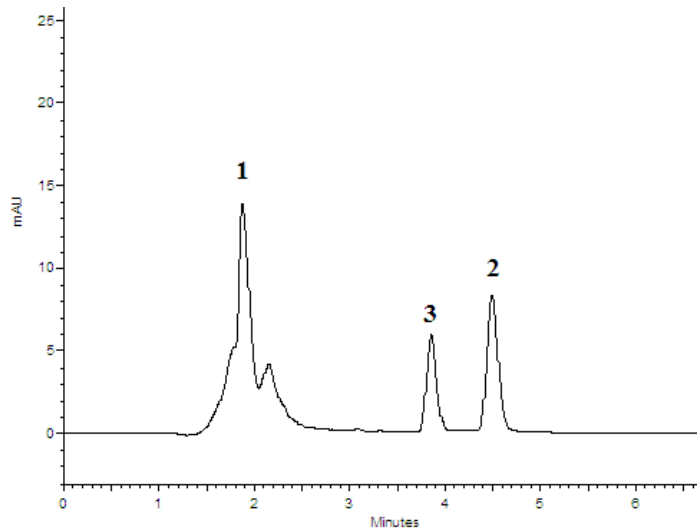


Mucor - P03

A

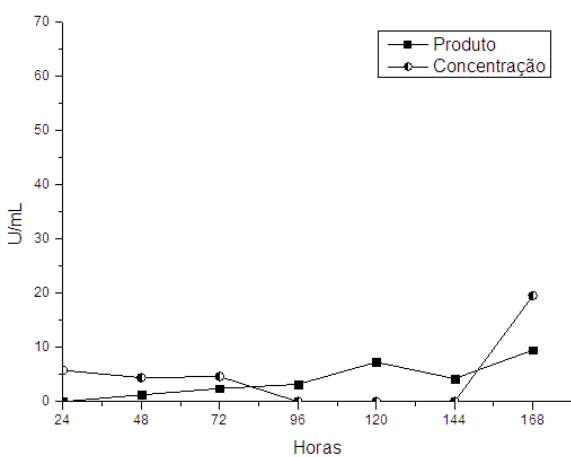


B

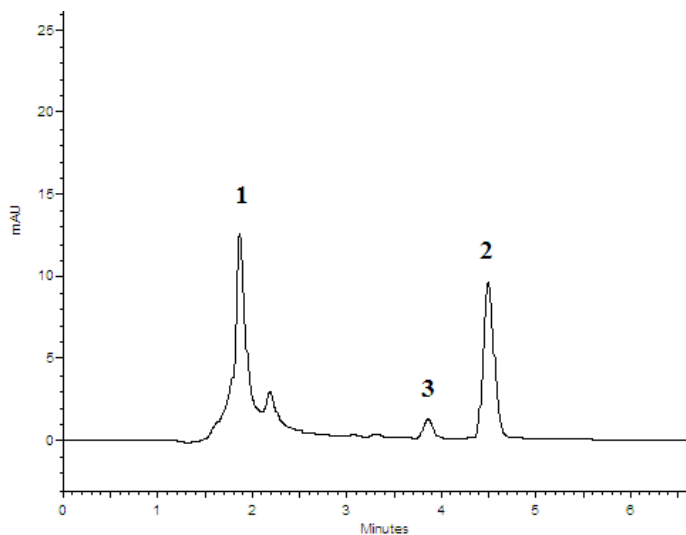


Paecilomyces - P07

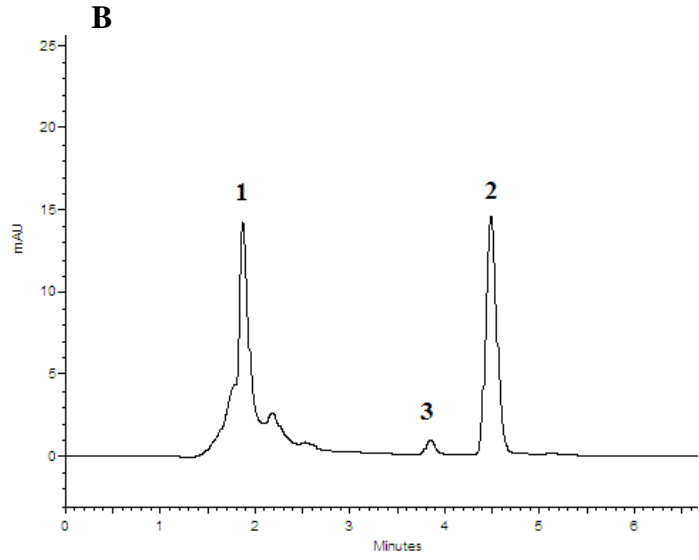
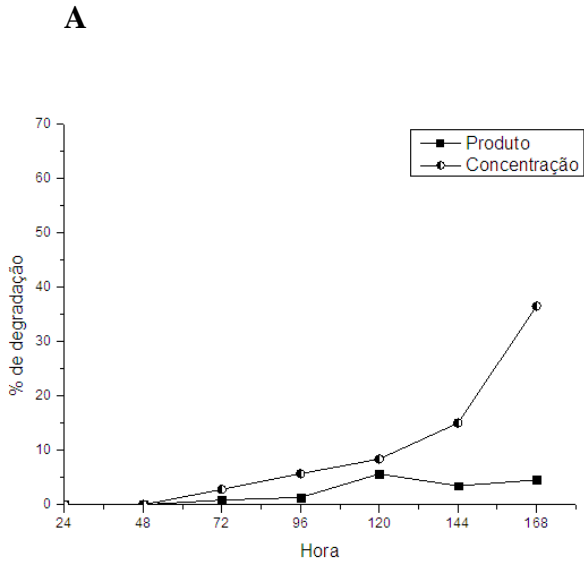
A



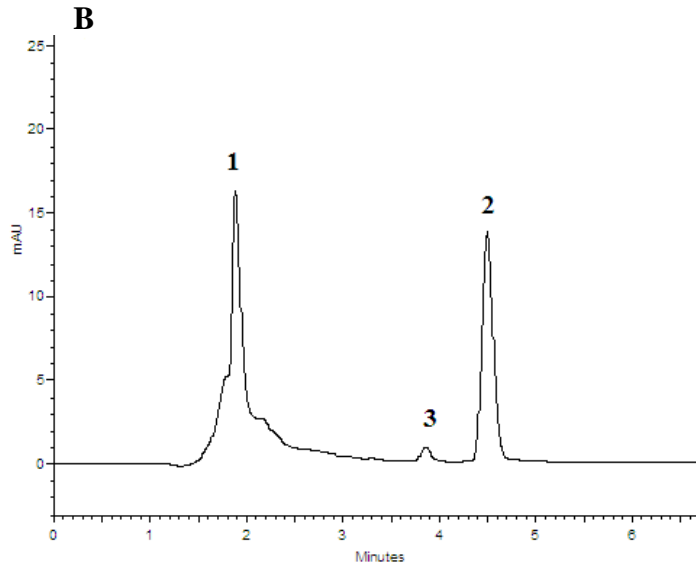
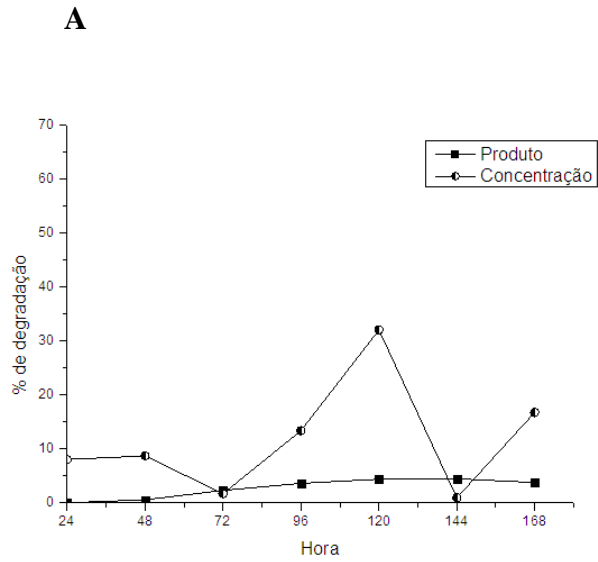
B



Absidia - P18



Aspergillus - P22



Acremonium - P24

