

CAROLINE HENN

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE BASIDIOMICETOS RESISTENTES AOS HERBICIDAS
ATRAZINA E DIUROM – PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E DEGRADAÇÃO
DOS COMPOSTOS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2009

CAROLINE HENN

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE BASIDIOMICETOS RESISTENTES AOS HERBICIDAS
ATRAZINA E DIUROM – PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTIICAS E DEGRADAÇÃO
DOS COMPOSTOS

Dissertação apresentada à banca examinadora
para exame geral de qualificação no Programa de
Pós Graduação, nível Mestrado, em
Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleni Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Boscolo

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

2009

Henn, Caroline.

Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos / Caroline Henn. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.
117 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Eleni Gomes

Co-orientador: Mauricio Boscolo

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biodegradação. 2. Microbiologia. 3. Fungos. I. Gomes, Eleni. II. Boscolo, Mauricio. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 579

CAROLINE HENN

Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes a altas concentrações dos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, 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
Professora Doutora
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Lucia Regina Durrant
Professora Doutora
Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Prof^ª Dr^ª Regina Teresa Rosim Monteiro
Professora Doutora
Universidade De São Paulo - USP

São José do Rio Preto, 04 de fevereiro de 2009

A todos os meus mestres.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Eleni, pela confiança, entusiasmo, dedicação e ensinamentos transmitidos.

Ao Mauricio, co-orientador, pela imensa paciência e por tudo que me ensinou.

À FAPESP, pela concessão de bolsa e suporte financeiro aos projetos do grupo.

Aos colegas e docentes do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pela bagagem pessoal e profissional transmitidas durante o trabalho e convívio ao longo do curso.

À minha família, pelo apoio e encorajamento - especialmente aos meus pais, Juraci e José, que nunca deixaram de acreditar nas minhas escolhas; também à Polaca e à Pritcha, pelo carinho sincero como só os bichos sabem ter, fazendo uma imensa festa nas espaçadas vezes que eu aparecia em casa.

As minhas grandes irmãs, Nô, Vanessa, Angela e Dani. Cada uma em um canto do Paraná, estiveram presentes como poucas pessoas nestes dois anos do mestrado. Compartilhando as angústias, as incertezas e também as alegrias nos e-mails, telefonemas ou nas vezes em que nos encontramos. Vocês foram, e continuam sendo indispensáveis.

Aos colegas de laboratório, Aline, Nati, Fabi, Ana Lúcia, Ricardo, Lívia, Ana Flávia, Paula, Helô, Rodrigo, Hamilton, Carol, Ellen Giese, Ellen Lago, Lílian, Rodolfo, Chang, Marcelo, Gisele, Lg, Márcia, Priscila, Rô, Roberto, Tássia, pelos momentos de descontração, pela ajuda e pelo aprendizado. E pelo imenso auxílio cuidando dos meus experimentos nas minhas viagens, e também durante as fases finais deste trabalho, uma menção destacada para a Aline, a Fabi e a Nati.

À Maíra, colega de mestrado, um agradecimento especial pelas linhagens fúngicas usadas nesta pesquisa.

Aos amigos que ficam para sempre juntos às boas lembranças deste período: Zé, Lu, Caio, Leandro, Salsicha, Pika, Barbara, Ge, Lana, Phil, Muri, Nayara, Marcelo (e não levem a mal se esqueci de alguém!). E ao meu amigo, vizinho e músico, Ciro.

RESUMO

A introdução de moléculas xenobióticas no ambiente muitas vezes ocorre sem que sejam conhecidos muitos de seus aspectos bioquímicos e toxicológicos fundamentais. A presença anéis aromáticos na estrutura molecular muitas vezes é o fator determinante da toxicidade, recalcitrância e propriedades mutagênicas associadas e muitos destes compostos. O papel dos insumos agrícolas neste processo é de particular relevância, devido ao seu caráter de liberação intencional no ambiente e dos crescentes volumes aplicados em todo o mundo. Neste trabalho, foram selecionadas linhagens de basidiomicetos com base na sua tolerância aos herbicidas atrazina e diurom, para estudo detalhado do potencial de degradação e do papel desempenhado pelas enzimas ligninolíticas no processo. A tolerância não se mostrou relacionada à degradação dos xenobióticos; esta foi muito eficiente para algumas linhagens estudadas, chegando a 38% da atrazina e 96% do diurom, por MCA 17 agaricales e SXS 320 *P. cubensis*, respectivamente, após 20 dias de cultivo. As linhagens mais tolerantes à atrazina, *Pluteus cubensis* SXS 320 e *Polyporus tenuiculus* MCA 11, e ao diurom, *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 e *Dacryopinax elegans* SXS 323, foram empregadas em ensaios mais detalhados para a degradação e produção de enzimas. Os efeitos de diferentes concentrações do diurom e da atrazina como única fonte de carbono ou em presença de fontes alternativas como glicose ou bagaço de cana (1%), foram determinados para os microrganismos tolerantes. Apenas *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 e *Polyporus tenuiculus* MCA 11 produziram lacases, única enzima do sistema ligninolítico detectada nas culturas. No caso de *Pycnoporus sanguineus*, as lacases foram constitutivamente produzidas em meio contendo glicose, atingindo 283 U.l⁻¹. A lacase de *P. tenuiculus*, por sua vez, foi produzida apenas em presença de constituintes lignocelulósicos naturais no meio de cultivo, chegando a 1.219 U.l⁻¹ em meio com farelo de trigo. As propriedades bioquímicas das lacases revelaram enzimas caracteristicamente mesofílicas, com temperaturas ótimas de 50 e 40°C, e pH ótimo de 2,5. Os fungos produtores das lacases, *Polyporus tenuiculus* e *Pycnoporus sanguineus*, removeram 39 e 56% da atrazina e do diurom após 40 dias de cultivo, respectivamente. No entanto, em reação conduzida nos parâmetros ótimos de atividade, as enzimas não catalisaram a degradação dos herbicidas; desta maneira, sua atuação isolada na remoção do xenobiótico pelos microrganismos não pôde ser confirmada, mas é possível que atue ligada a biomassa ou associada a outros cofatores e enzimas cuja atividade não pôde ser detectada.

ABSTRACT

The introduction of xenobiotic molecules in the environment often occurs without the knowledge about many basic aspects related to biochemistry and toxicology. The aromatic ring presence in their molecular structure many times is the determinant feature for toxicity, recalcitrance and mutagenic properties associated with those compounds. The role of agricultural chemicals in this process has particular relevance, due to their intentional release on environment and the crescent volumes employed worldwide. In this work, basidiomycete strains were chosen based on their tolerance to herbicides atrazine and diuron, for detailed study of the fungi's degradative potential and the role developed by ligninolytic enzymes in this process. The tolerance was not related to xenobiotic's degradation, which was very efficient for many strains, reaching 38% for atrazine and 96% for diuron, by MCA 17 Agaricales and SXS 320 *Pluteus cubensis*, respectively, after 20 days in culture. Those ones more tolerant to atrazine, *Pluteus cubensis* SXS 320 and *Polyporus tenuiculus* MCA 11, and for diuron, *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and *Dacryopinax elegans* SXS 323, were employed in assays focusing on degradation and enzyme production. The effect of different concentrations of diuron and atrazine as sole carbon source or in presence of alternative sources, like glucose and sugarcane bagasse (1%), were determined for tolerant microorganisms. Only *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and *Polyporus tenuiculus* MCA 11 have produced laccases, the unique enzyme of ligninolytic system detected in cultures. For *Pycnoporus sanguineus*, the laccases were constitutively produced in medium containing glucose, reaching 238 U.l⁻¹. The laccase from *P. tenuiculus* was released only with the presence of lignocellulosic constituents in culture medium, resulting in 1,219 U.l⁻¹ in medium containing wheat bran. The biochemical properties of laccases showed enzymes characteristically mesophilic, with optimal temperatures of 50 and 40 °C, and optimum pH of 2.5. The laccase producing fungi, *Polyporus tenuiculus* and *Pycnoporus sanguineus*, removed 39% and 56% of atrazine and diuron after 40 days of incubation in culture, respectively. However, in reaction developed adjusting the physic-chemical parameters to allow the best activity, the enzymes didn't catalyze herbicide degradation. So, their isolated involvement in the xenobiotic removal by the microorganisms could not be confirmed, but is possible that it works bounded to biomass and associated to another cofactors and enzymes whose activity could not be detected.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fórmula estrutural do diurom.....	6
Figura 2. Estrutura química da atrazina.....	8
Figura 3. Estrutura química da lignina das gimnospermas.....	10
Figura 4. Ciclo catalítico das lacases evidenciando sua atuação sobre substratos fenólicos...13	13
Figura 5. Mecanismo de atuação do sistema lacase-mediador.....	14
Figura 6. Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP).....	17
Figura 7. Ciclo catalítico das peroxidases dependentes de manganês.....	19
Figura 8. Mecanismo de abertura de anéis aromáticos por manganês peroxidases.....	20
Figura 9. Curva de crescimento de <i>Gloelophyllum striatum</i> MCA 2 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....	48
Figura 10. Curva de crescimento de <i>Datronia caperata</i> MCA 5 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....	48
Figura 11. Curva de crescimento de <i>Trametes modesta</i> MCA 6 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....	49
Figura 12. Curva de crescimento de <i>Gloelophyllum striatum</i> MCA 7 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....	49
Figura 13. Curva de crescimento de <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 9 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....	50
Figura 14. Curva de crescimento de <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....	50

- Figura 15.** Curva de crescimento de *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....51
- Figura 16.** Curva de crescimento de Agaricales MCA 17 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....51
- Figura 17.** Curva de crescimento de *Polyporus sp.* MCA 128 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....52
- Figura 18.** Curva de crescimento de *Hexagonia hirta* MCA 131 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....52
- Figura 19.** Curva de crescimento de *Datronia stereoides* MCA 167 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....53
- Figura 20.** Curva de crescimento de *Pluteus cubensis* SXS 320 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....53
- Figura 21.** Curva de crescimento de *Dacryopinax elegans* SXS 323 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações.....54
- Figura 22.** Curva de crescimento de *Gloelophyllum striatum* MCA 2 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....56
- Figura 23.** Curva de crescimento de *Datronia caperata* MCA 5 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....56
- Figura 24.** Curva de crescimento de *Trametes modesta* MCA 6 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....57
- Figura 25.** Curva de crescimento de *Gloelophyllum striatum* MCA 7 em meio BDA contendo diurom e duas concentrações.....57
- Figura 26.** Curva de crescimento de *Polyporus tenuiculus* MCA 9 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....58
- Figura 27.** Curva de crescimento de *Polyporus tenuiculus* MCA 11 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....58

Figura 28. Curva de crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA 16 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....	59
Figura 29. Curva de crescimento de Agaricales MCA 17 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....	59
Figura 30. Curva de crescimento de <i>Polyporus</i> sp. MCA 128 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....	60
Figura 31. Curva de crescimento de <i>Hexagonia hirta</i> MCA 131 em meio BDA contendo diurom e duas concentrações.....	60
Figura 32. Curva de crescimento de <i>Datronia stereoides</i> MCA 167 em meio BDA contendo diurom.....	61
Figura 33. Curva de crescimento de <i>Dacryopinax elegans</i> SXS 323 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações.....	61
Figura 34. Efeito da concentração do diurom no crescimento e produção de enzimas por <i>P. sanguineus</i> , cultivado em glicose ou bagaço de cana por 20 dias.....	70
Figura 35. Desenvolvimento de <i>D. elegans</i> SXS 323, em culturas suplementadas com glicose.....	72
Figura 36. Produção de enzimas ligninolíticas e crescimento de <i>P. sanguineus</i> em meio contendo glicose.....	73
Figura 37. Propriedades bioquímicas da lacase de <i>P. sanguineus</i> , MCA 16.....	76
Figura 38. Estabilidade térmica da lacase de <i>P. sanguineus</i> MCA 16.....	77
Figura 39. Representação esquemática das possíveis vias de degradação microbiana do diurom.....	79
Figura 40. Remoção do diurom em culturas de <i>P. sanguineus</i>	80
Figura 41. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA 16, e ausência e em presença do diurom.....	82

Figura 42. Concentração do diurom e atividade residual da lacase de <i>P. sanguineus</i> após incubação em sistema de reação empregando ABTS como mediador, 40°C.....	85
Figura 43. Desenvolvimento de <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11, e produção de lacases em meio contendo 1% de glicose como fonte de carbono e diferentes concentrações de atrazina.....	86
Figura 44. Crescimento e produção de lacases por <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11, em meio suplementado com 1% de bagaço de cana e diferentes concentrações de atrazina.....	87
Figura 45. Produção de lacases por <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11, em diferentes composições do meio de cultivo.....	87
Figura 46. Desenvolvimento (a) e consumo de carbono no meio (b) por <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11 ao longo de 40 dias de cultivo.....	89
Figura 47. Desenvolvimento (a) e consumo de carbono no meio (b) por <i>Pluteus cubensis</i> SXS 320 ao longo de 40 dias de cultivo.....	89
Figura 48. Via degradativa hidrolítica da atrazina, elucidada para a linhagem bacteriana <i>Pseudomonas</i> sp. linhagem ADP.....	91
Figura 49. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11, em ausência e em presença da atrazina.....	93
Figura 50. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo <i>Pluteus cubensis</i> SXS 320, em ausência e em presença da atrazina.....	94
Figura 51. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo <i>Pluteus cubensis</i> SXS 320, com alta concentração de N após 40 dias e baixa concentração de N após 96 dias.....	96
Figura 52. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo <i>Pluteus cubensis</i> SXS 320, após 20 dias em meio com deficiência de nitrogênio e diurom.....	97
Figura 53. Propriedades da lacase de <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11.....	99
Figura 54. Termoestabilidade da lacase de <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11... ..	100

Figura 55. Concentração da atrazina e atividade residual da lacase de *P.tenuiculus* após incubação em sistema de reação empregando ABTS como mediador, a 40°C.....102

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais metabólitos da atrazina e respectivas estruturas químicas.....	9
Tabela 2. Taxa de crescimento diário, adensamento micelial e inibição relativa do crescimento fúngico nas duas concentrações de atrazina utilizadas no meio BDA	55
Tabela 3. Características de inibição, velocidade de crescimento e adensamento micelial das doze linhagens cultivadas em meio BDA contendo diurom.....	62
Tabela 4. Crescimento e remoção dos herbicidas atrazina e diurom, em meio líquido sintético pelas linhagens de basidiomicetos estudadas.....	65
Tabela 5. Produção de enzimas ligninolíticas nos meios contendo diurom e atrazina. Atividade enzimática expressa em U.g ⁻¹ de biomassa.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico)

BDA: batata-dextrose-ágar

BOD: *Biochemical Oxygen Demand*

CAS: *American Chemical Society*

Cys: cisteína

DMP: 2,6 – dimetoxifenol

D.O.: densidade óptica

EC: *Enzyme comission* (classificação bioquímica das enzimas)

g: gravidade

His: histidina

HPLC: *high performance liquid chromatography*

Koc: coeficiente de partição octanol – carbono orgânico

Lac: lacase

LiP: lignina peroxidase

$M^{-1}cm^{-1}$: molar por centímetro

MnP: manganês peroxidase

mPa: mili – pascal

nm: nanômetros

ppm: partes por milhão

rpm: rotações por minuto

U: unidade de atividade enzimática

U.g⁻¹: unidades por grama

U.l⁻¹: unidades por litro

VA: álcool veratrílico ou 3,4-dimetoxibenzil álcool

μl: microlitro

μm: micrometro

μmol: micromol

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Defensivos agrícolas	4
2. 1. 1. Diurom	5
2. 1. 2. Atrazina	8
2. 2. O sistema enzimático ligninolítico.....	10
2. 2. 1. Lacases	12
2.2.2. Lignina peroxidases.....	15
2.2.3. Manganês peroxidases.....	18
2. 3. Biorremediação no tratamento de xenobióticos	20
2. 3.1. Potencial dos fungos basidiomicetos e enzimas ligninolíticas em biorremediação.....	24
3. OBJETIVOS	28
3.1. Geral.....	28
3.2. Específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4. 1. Microrganismos.....	30
4.2. Herbicidas	31
4. 3. Seleção das cepas tolerantes aos herbicidas.....	31
4. 4. Pré-inóculo	33

4. 5. Cultivo em meio líquido e produção das enzimas	35
4. 6. Determinação das atividades enzimáticas.....	36
4. 6. 1. Lacase.....	36
4. 6. 2. Manganês peroxidases (MnP).....	37
4. 6. 3. Lignina peroxidases (LiP).....	38
4. 7. Avaliação da produção de enzimas em diferentes concentrações dos herbicidas.....	39
4. 8. Curva de crescimento e produção de enzimas.....	40
4.9. Efeito das fontes de carbono e moléculas indutoras na produção de enzimas.....	40
4. 10. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade das lacases	41
4.11. Ensaio para degradação enzimática dos herbicidas.....	42
4.12. Análise cromatográfica para avaliação da degradação dos herbicidas pelos fungos.....	43
4.13. Outras determinações analíticas.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5. 1. Seleção dos fungos tolerantes aos pesticidas	45
5. 2. Fermentação de superfície dos fungos em meio contendo diurom ou atrazina.....	63
5. 3. Fermentação de superfície dos fungos em diferentes concentrações do diurom	68
5. 4. Produção de enzimas ligninolíticas por <i>Pycnoporus sanguineus</i> ao longo do processo fermentativo.....	72
5. 5. Caracterização da lacase produzida por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	74
5.6. Metabolismo do diurom por <i>Pycnoporus sanguineus</i> em cultura.....	77
5.7. Estudo da degradação do diurom <i>in vitro</i> pela lacase de <i>P. sanguineus</i>	83
5.8. Fermentação de superfície dos fungos em diferentes concentrações de atrazina.....	85
5.9. curva de crescimento de <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA 11 e <i>Pluteus cubensis</i> SXS 320.....	88
5.10. Caracterização da lacase produzida por <i>Polyporus tenuiculus</i>	98
MCA 11	98
5.11. Atuação das lacases de MCA 11 sobre a atrazina <i>in vitro</i>	101
6. CONCLUSÕES.....	103

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

8. APÊNDICES..... 116

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma série de processos industriais, ambientais e em química fina vem sendo consideravelmente aprimorados graças ao desenvolvimento da tecnologia enzimática, permitindo a utilização de biocatalisadores em conversão química com elevada eficiência. Como tecnologia voltada para aplicação ambiental, enzimas livres ou imobilizadas, associadas ou não ao microrganismo produtor, podem ser empregadas com sucesso, *in situ* ou em biorreatores, na recuperação de áreas contaminadas e no tratamento de efluentes de alta complexidade ou contendo xenobióticos, minimizando a geração de subprodutos e resíduos.

Em razão da notável versatilidade do mecanismo catalítico, que resulta em um amplo espectro de possíveis substratos, as enzimas ligninolíticas tornaram-se foco de intensas pesquisas. Produzidas predominantemente por fungos basidiomicetos, lacases (EC 1.10.3.2), manganês peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13) e lignina peroxidases (LiP, EC 1.11.1.14) oxidam substratos aromáticos fenólicos e não fenólicos, resultando na formação de radicais altamente reativos que deflagram reações não enzimáticas, que consistem quebras alquil-arílicas, remoção de cadeias laterais e abertura de núcleos aromáticos.

A regulação fisiológica e as propriedades bioquímicas das ligninases de espécies consideradas referências na produção deste sistema enzimático, como aquelas pertencentes aos gêneros *Phanerochaete*, *Trametes*, *Lentinus* ou *Pleurotus*, têm sido estudadas, e sua aplicação foi demonstrada com sucesso na mineralização ou transformação química associada à redução da toxicidade de moléculas recalcitrantes, que incluem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, organoclorados, organofosforados, combustíveis, pesticidas e solventes de diferentes classes químicas. Devido às características de crescimento dos fungos, as enzimas ligninolíticas podem ser produzidas em grande escala em sistemas de fermentação

relativamente simples, utilizando resíduos agroindustriais como substrato para o crescimento microbiano; o substrato colonizado pelo micélio pode inclusive servir como inóculo e fonte de carbono primária pra estabelecimento do microrganismo no solo, na biorremediação de locais contaminados, permitindo a secreção das enzimas e co-metabolismo dos xenobióticos.

Os maiores problemas de contaminação dos solos estão diretamente relacionados às práticas agrícolas. Milhões de toneladas de agrotóxicos são produzidas e liberadas anualmente, muitas vezes sem acompanhamento técnico, em volumes muito superiores aos recomendados e em locais inadequados, como áreas de recarga de aquíferos, proximidades de rios e nascentes, incorrendo em sérios riscos para a saúde humana e equilíbrio ambiental. Pesquisas realizadas em todo o mundo constataam o alarmante crescimento dos registros de contaminação de água destinada ao abastecimento, em decorrência da utilização intensiva e acúmulo de pesticidas aromáticos halogenados que apresentam alto grau de toxicidade e persistência.

A natureza filamentosa e a capacidade de colonização e desenvolvimento dos fungos basidiomicetos, associados à produção das enzimas ligninolíticas de forma constitutiva ou induzida (geralmente pela escassez de matéria orgânica), fazem deste grupo de microrganismos uma ferramenta ímpar entre as novas tecnologias de baixo impacto para recuperação ambiental. No entanto, como a atuação das oxidoredutases sobre os substratos aromáticos é de natureza inespecífica, a compreensão das rotas de degradação e o monitoramento dos produtos da ação enzimática são necessários para cada caso, a fim de atestar a segurança e a afetividade do processo.

Tendo em vista o exposto, este trabalho teve por objetivos selecionar fungos basidiomicetos nativos da região Noroeste Paulista tolerantes aos herbicidas atrazina e diurom, largamente empregados em culturas de cana de açúcar, e verificar o potencial de

degradação destes compostos pelos microrganismos, a produção e atuação das enzimas ligninolíticas e os possíveis derivados resultantes da ação enzimática sobre esses herbicidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

Os eventos de contaminação ambiental envolvendo moléculas tóxicas e persistentes são passíveis em decorrência das atividades agrícolas, associados à produção, transporte e aplicação de insumos, assim como a disposição final de resíduos. Entre as atividades potencialmente poluidoras, as práticas agrícolas figuram em situação particularmente importante, devido à constante liberação de pesticidas no ambiente. Frequentemente, os riscos de contaminação ambiental são agravados pela falta de acompanhamento técnico e utilização em locais inadequados, como sítios de recarga de aquíferos. São milhões de toneladas de pesticidas aplicados anualmente em todo o mundo, o que reflete em um aumento no número e na gravidade das ocorrências de contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas (BORDJIBA *et al.*, 2001; EERD *et al.*, 2003; GIANFREDA, RAO, 2004).

O sistema de agricultura intensiva, praticado em larga escala em todo o mundo, gera ecossistemas desequilibrados, nos quais as monoculturas são mantidas à custa de herbicidas, fungicidas e inseticidas para o controle de pragas. No Brasil, a expansão de área plantada de cana-de-açúcar, impulsionada pela demanda crescente do etanol como matriz energética nacional, é acompanhada pelo aumento no consumo de insumos específicos para a cultura. Segundo dados da Conab (Companhia Nacional do Abastecimento), a área plantada em 2007 foi de 6,6 milhões de hectares, concentrados na região Centro-Sul do país, e superior em 7,4% à área cultivada no ano anterior. Nesse período, o consumo de agroquímicos cresceu muito,

com o faturamento do setor saltando de 1,2 para 4,4 bilhões de reais entre 2002 e 2004, e segue em franca expansão, sendo que os herbicidas respondem por 40% do volume de insumos para controle de pragas (FARIA, FASSA, FACCHINI, 2007).

Conforme destacam Armas e colaboradores (2005) os herbicidas compõem a classe de agroquímicos mais utilizada na cana-de-açúcar, sendo que os princípios ativos ametrina, 2,4-D, acetocloro, diurom, atrazina e glifosato respondem pela maior parte do volume de aplicações. Destes, a atrazina e o diurom exibem maior tempo de meia vida no solo e são considerados móveis (e portanto suscetíveis à lixiviação) merecendo, desta forma, atenção especial em relação aos riscos de contaminação do solo e dos recursos hídricos.

2.1.1. DIUROM

O diurom (N-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetiluréia; CAS N° 330-54-1) pertence à família química das fenilamidas, subclasse das feniluréias (GIACOMAZZI, COCHET, 2004), e à classe toxicológica III (medianamente tóxico). Com meia vida média 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 $5,1 \cdot 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$), e como outras feniluréias, apresenta baixa solubilidade em água (42,0 mg.l⁻¹ a 25°C), sendo, portanto, mais facilmente lixiviado em solos com baixo teor de matéria orgânica. Além da cana-de-açúcar, o diurom é utilizado em culturas de abacaxi, algodão, café e citros, em pré e pós-emergência das plantas

infestantes (ARMAS *et al.*, 2005; GIACOMAZZI, COCHET, 2004; SØRENSEN *et al.*, 2003; TIXIER *et al.*, 2000).

A atividade herbicida do diurom, que afeta inclusive algas e cianobactérias, deriva da inibição do transporte de elétrons nas membranas fotossintéticas. O diurom compete com a plastoquinona (Q_B) pelo sítio de ligação desta à proteína D1 do fotossistema II, interrompendo 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 estrutura do diurom é apresentada na figura 1.

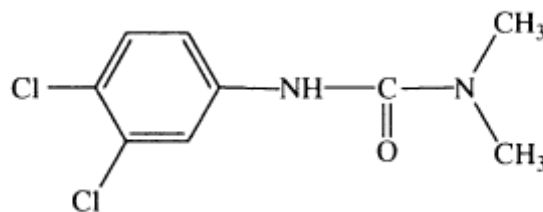


FIGURA 1. Fórmula estrutural do diurom (GOODDY, CHILTON, HARRISON, 2002).

A toxicidade do diurom contra organismos não-fotossintéticos é devida à semelhança estrutural existente entre os sítios de inibição situados na proteína D₁ do fotossistema II e no complexo bc₁ da cadeia respiratória dos eucariotos (RAGO, COLSON, 1988). Embora não haja evidências de mutagenicidade associada à exposição ao diurom e a teratogenicidade só tenha sido verificada com a administração de doses tão altas quanto 250 mg.kg⁻¹ dia⁻¹, seu principal metabólito, 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) pode induzir aneuploidias em células de

mamíferos por interação com o aparelho mitótico. É ainda moderadamente tóxico para peixes e afeta a diversidade microbiana no solo (GIACOMAZZI, COCHET, 2004; SEBAI *et al.*, 2004).

A 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA; CAS N° 95-76-1) é o principal produto de degradação biótica ou abiótica detectado a partir do diurom. Metabólito comum das feniluréias, este composto é capaz de reagir formando 3,3', 4,4'- tetracloroazobenzeno (TCAB), altamente tóxico, ou ainda sofrer polimerização com compostos húmicos do solo e se tornar ainda mais recalcitrante e menos biodisponível (BOLLAG, MINARD, LIU, 1983; KEARNEY, PLIMMER, 1972). Já foram descritos muitos microrganismos capazes de metabolizar parcialmente o diurom, principalmente bactérias, porém, até o momento, não foram identificados fungos capazes de mineralizar o anel aromático presente na molécula do herbicida. A maioria dos estudos envolvendo fungos ou bactérias aponta para efeitos da biotransformação do composto, com a formação de metabólitos mais tóxicos do que o próprio diurom. Além da 3,4-DCA e do TCAB, já mencionados, foram também descritos como produtos de atividade microbiana sobre o diurom o N-(3,4-diclorofenil)-N-metiluréia, forma monodemetilada que apresenta atividade herbicida reduzida em relação ao diurom, e N-3,4-diclorofeniluréia, produto sem atividade herbicida (DELLAMATRICE, MONTEIRO, 2004; GIACOMAZZI, COCHET, 2004; TIXIER *et al.*, 2000).

A degradação de compostos aromáticos clorados, como é o caso do diurom, é dificultada proporcionalmente ao nível de substituição por halogênios, que bloqueiam o acesso das enzimas às ligações moleculares e alteram o potencial de oxidorredução do composto. Muitas vezes, a mineralização completa requer etapas anaeróbias, envolvendo de-halogenação redutiva (ATLAS, BARTHA, WESLEY, 1997; SØRENSEN *et al.*, 2003).

2. 1. 2. ATRAZINA

A atrazina [2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina], CAS N° 1912-24-9, pertence à classe química das triazinas, compostos cujo anel aromático alterna átomos de carbono e nitrogênio (MOUGIN *et al.*, 1994). Incluída na classe toxicológica III, apresenta baixa solubilidade em água (30 mg.l^{-1}) e meia vida média no solo de cerca de 146 dias. Como sugere o baixo coeficiente de partição octanol-água, não se adsorve substancialmente ao solo, figurando freqüentemente entre os pesticidas encontrados acima dos níveis toleráveis pelas agências de controle ambiental em águas superficiais e lençóis freáticos (ABATE, MASINI, 2005; ARMAS *et al.*, 2005).

Empregada como herbicida em culturas pré e pós-emergentes de cana de açúcar, milho e sorgo contra plantas daninhas de folhas largas, a atrazina é absorvida pelo sistema radicular e inibe a etapa fotoquímica da fotossíntese (BARID, 2002; DONNELLY, ENTRY, CRAWFORD, 1993).

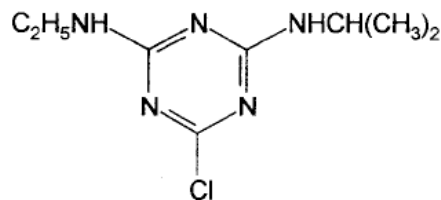


FIGURA 2. Estrutura química da atrazina (LANCHOTE *et al.*, 2000).

As rotas de degradação da atrazina são bem elucidadas em bactérias. *Pseudomonas* sp. é considerada o organismo modelo desta via bioquímica, que envolve dealquilação sequencial, deaminação, dealogenação e clivagem do anel aromático, catalisadas por hidrolases (RALEBITSO, SENIOR, VERSEVELD, 2002). As cadeias alquílicas podem ser utilizadas pelos microrganismos em seu metabolismo primário, mas o carbono do anel é oxidado e não aproveitado (BARID, 2002; RITTMANN, McCARTY, 2001). Com o avanço dos estudos foram reconhecidas outras linhagens com capacidade de conversão completa da molécula até CO₂, como *Agrobacterium radiobacter* J14A e *Pseudoaminobacter* sp. Os fungos geralmente modificam parcialmente a atrazina a metabólitos que podem então ser mineralizados por bactérias (MASAPHY *et al.*, 1993). Alguns dos produtos de degradação microbiana são a desetilatrazina (2-cloro-4-etilamino-6-amino-1,3,5-triazina), desisopropilatrazina (2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina), desetil-desisopropilatrazina (2-cloro-4-amino-6-amino-1,3,5-triazina), hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) e 2-cloro-4-etilamino-6-(1-hidroxiisopropil)amino-1,3,5-triazina (Tab.1). Como a molécula parental, são compostos regulados por órgãos de monitoramento ambiental, com base em evidências de carcinogenicidade (MASAPHY *et al.*, 1993; RALEBITSO, SENIOR, VERSEVELD, 2002).

TABELA 1. Principais metabólitos da atrazina (MOUGIN *et al.*, 1997).

Grupo Funcional			Nome comum	Abreviação
R ₁	R ₂	R ₃		
Cl	C ₂ H ₅	iso C ₃ H ₇	Atrazina	AT
Cl	H	iso C ₃ H ₇	Deetilatrazina	CIAT
Cl	C ₂ H ₅	H	Deisopropilatrazina	CEAT
Cl	H	H	Deetildeisopropilatrazina	CAAT
OH	C ₂ H ₅	iso C ₃ H ₇	Hidroxiatrazina	OIET

2. 2. O SISTEMA ENZIMÁTICO LIGNINOLÍTICO

A lignina (figura 3) é um heteropolímero amorfo, resultante da condensação de unidades fenilpropanóides derivadas de fenilalanina, por meio de ligações éter e carbono-carbono (HIGUCHI, 2004; WHETTEN, SEDEROFF, 1995). É o segundo polímero natural mais abundante, conferindo rigidez aos tecidos vegetais e protegendo-os do ataque de enzimas produzidas por fitopatógenos. Mesmo após a morte da planta, a lignina continua dificultando o acesso dos microrganismos decompositores da madeira às suas fontes primárias de carbono e energia, a celulose e as hemiceluloses (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

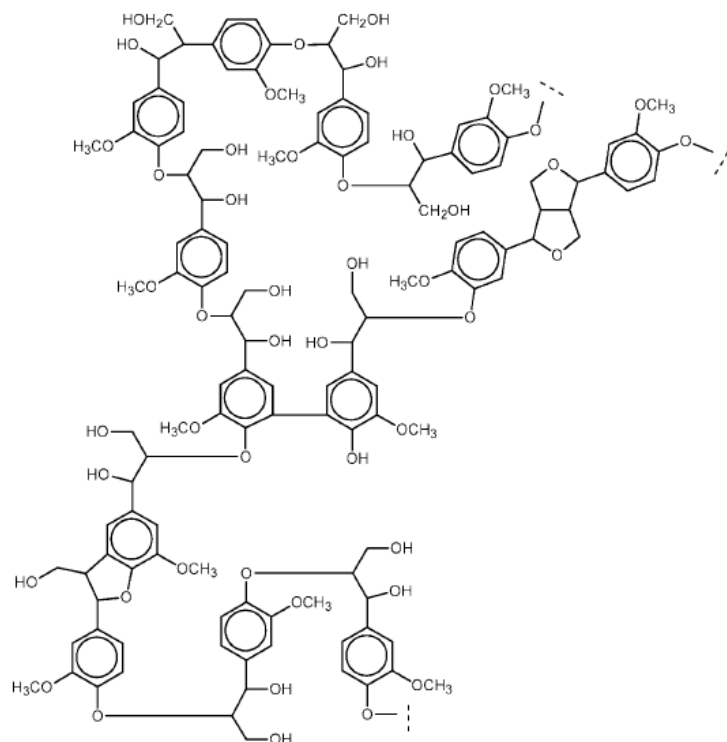


FIGURA 3. Estrutura da lignina encontrada em gimnospermas. Nas angiospermas, as unidades fenilpropanóides apresentam dois grupos metoxil em posição orto em relação ao oxigênio. (PÉREZ *et al.*, 2002).

Enquanto as macromoléculas de estrutura regular, como a celulose, contam com sistemas enzimáticos hidrolíticos para sua degradação, a composição complexa e heterogênea da lignina exigiu o desenvolvimento de um sistema catalítico peculiar pelo grande número de enzimas e formas de atuação (EVANS *et al.*, 1994). Produzidas em grandes quantidades por fungos basidiomicetos, as enzimas ligninolíticas se destacam entre as oxidorreduções, atuando sobre seus substratos de forma difusa, inespecífica, por vezes indireta e orientada basicamente pelas diferenças entre os potenciais de oxidação-redução dos substratos e enzimas (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; POINTING, 2001).

A consequência da não especificidade por substrato, apresentada pelas ligninases, é a susceptibilidade de muitas espécies químicas, incluindo xenobióticos com estrutura aromática semelhante às unidades monoméricas da lignina, à ação destas enzimas (LEVIN, VIALE, FORCHIASSIN, 2003; RABINOVICH, BOLOBOVA, VASILCHENKO, 2004). Este fenômeno, conhecido como co-metabolismo, consiste na transformação de um composto químico por enzimas ou cofatores expressos para atuar sobre outros substratos; as moléculas não são aproveitadas como fontes de carbono ou energia por parte dos microrganismos protagonistas das vias co-metabólicas. Muitas vezes, as enzimas responsáveis pelo co-metabolismo de um composto podem ser induzidas em condições específicas e aplicadas para degradar um determinado poluente. Dentre a grande variedade de enzimas envolvidas na degradação da lignina, diferentes combinações de lignina peroxidases (EC 1.11.1.14), lacases (EC 1.10.3.2) e manganês peroxidases (1.11.1.13) constituem a base do sistema enzimático dos fungos ligninolíticos (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; RITTMANN, McCARTY, 2001).

2. 2. 1. LACASES

As lacases (*p*-difenol:oxigênio oxidorredutases, EC 1.10.3.2) são glicoproteínas formadas por 520 e 550 resíduos de aminoácidos, exibindo peso molecular médio de 60 a 80 kDa e encontradas sob a forma monomérica ou homodimérica. São chamadas de multicobre oxidases por possuírem 4 átomos de cobre distribuídos em 3 domínios de seu sítio ativo (T1, T2 e T3). O cobre localizado no sítio T1 é o responsável pela forte absorção da enzima na faixa dos 600nm; no entanto já foram descritas lacases deficientes de cobre em T1, chamadas de lacases brancas, devido à ausência da absorbância característica na faixa do azul (BALDRIAN, 2006; DURÁN, ESPOSITO, 2000; MOUGIN *et al.*, 2003).

Estas enzimas são amplamente distribuídas entre vegetais, nos quais estão envolvidas nos processos de biossíntese da lignina. Em fungos, desempenham funções relacionadas à morfogênese, pigmentação, interação com a planta hospedeira, no caso de fitopatógenos, e degradação da lignina por microrganismos saprófitos, especialmente basidiomicetos (BALDRIAN, 2006; YOUN, HAH, KANG, 1995).

O mecanismo de catálise está fundamentado na redução tetraeletrônica do oxigênio molecular formando água, à custa de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato. O ciclo catalítico das lacases (figura 4) inicia com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado à T1 extrai elétrons do substrato e os transfere para o domínio trinuclear T2/T3, que liga o O₂ e o reduz a H₂O, ao mesmo tempo em que libera o substrato oxidado. Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos Cα e desmetilações (BALDRIAN, 2006; MOUGIN *et al.*, 2003).

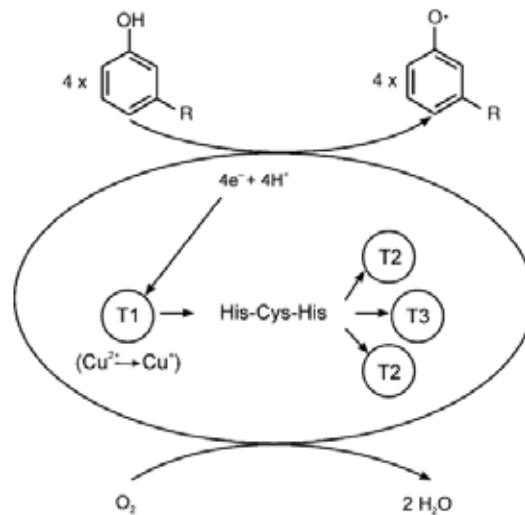


FIGURA 4. Ciclo catalítico das lacases evidenciando sua atuação direta sobre substratos fenólicos. His-Cys-His correspondem à disposição dos principais aminoácidos no sítio ativo (BALDRIAN, 2004).

As oxidações resultantes da atividade das lacases podem ocorrer diretamente, por interação enzima-substrato, quando se trata de compostos fenólicos. Em razão do baixo potencial de oxidorredução das enzimas (450-800mV), as lacases são incapazes de atuar sobre moléculas aromáticas não-fenólicas. No entanto, em trabalho realizado com lacases purificadas de *Coriolus versicolor*, Bourbonnais e Paice (1990) evidenciaram a atuação das lacases sobre substratos não fenólicos, quando em presença de uma molécula mediadora. Os mediadores, substâncias de baixo peso molecular secretadas pelo fungo (3- hidroxiantranilato, álcool veratrílico, 4-hidrobencil álcool, benzaldeído, anisalaldeído aminoácidos e derivados, entre outros) quando oxidados pelas lacases, são capazes de oxidar compostos que não seriam alvos diretos da enzima. O fenômeno da mediação (figura 5) amplia significativamente a

gama de substratos das lacases (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; LEONOWICZ *et al.*, 1999; SILVA, GOMES, 2004).

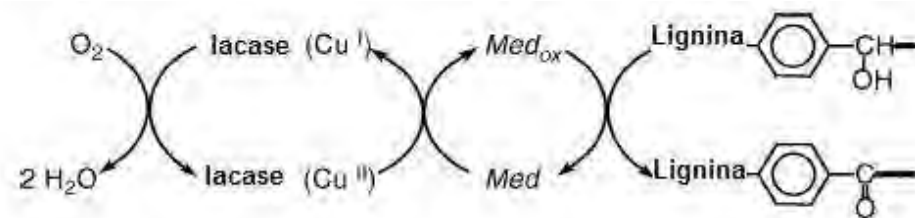


FIGURA 5. Mecanismo de reação lacase-mediador (Med); estruturas não fenólicas podem ser oxidadas por ação do mediador. (BRANCHI, GALLI, GENTILI, 2005).

As lacases são encontradas em vegetais e microrganismos, com destaque para os fungos filamentosos, que sintetizam uma ou mais formas induzíveis ou constitutivas das enzimas, envolvidas na morfogênese, síntese de pigmentos, interações parasito-hospedeiro e degradação da lignina (CLAUS, 2003; MAYER, STAPLES, 2002). Entre os chamados grupos fisiológicos de fungos, as lacases são mais difundidas entre basidiomicetos causadores de podridão branca, nas formas intra e extracelular. As formas citoplasmáticas geralmente representam uma pequena fração da atividade total, e estariam envolvidas com modificações de componentes fenólicos celulares, enquanto as extracelulares atuam sobre a lignina e outros substratos de alto peso molecular (BALDRIAN, 2006).

As lacases apresentam expressão muitas vezes constitutiva, que aliada à indução em presença de compostos xenobióticos no meio de crescimento dos microrganismos, atestam as

potencialidades singulares destas enzimas como ferramentas da engenharia bioquímica voltados para a biorremediação (GORBATOVA *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2002).

2.2.2. LIGNINA PEROXIDASES

A lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) é uma glicoproteína portadora de grupo prostético ferro-protoporfirina IX (heme) exibindo atividade dependente de H₂O₂, classificada entre as peroxidases de classe II e foi a primeira enzima identificada como parte do sistema ligninolítico em fungos basidiomicetos (SILVA, GOMES, 2004). Com massa molar variando entre 38 e 45 kDa, são muito semelhantes às peroxidase dependentes de manganês (MnP) em estrutura e função. A especificidade catalítica inerente a cada uma delas seria resultante de diferenças sutis nos sítos de ligação aos substratos (ESPOSITO AZEVEDO, 2004; CAMERON, TIMOFEEVSKI, AUST, 2000).

A estrutura protéica da lignina peroxidase conta com 8 pontes dissulfeto, 2 sítios de ligação de Ca²⁺ e o grupo heme pentacoordenado com um resíduo de histidina como ligante proximal axial. O sítio de ligação ao peróxido de hidrogênio é constituído por resíduos de arginina e histidina. A diversidade de substratos, variando desde pequenas moléculas fenólicas até grandes porções de lignina sugere que ao menos um dos sítios de ligação ao substrato estaria situado na superfície da enzima e compreenderia resíduos de aminoácidos aromáticos ou não-polares (CAMERON, TIMOFEEVSKI, AUST, 2000).

O peróxido de hidrogênio necessário à atividade da LiP pode ser oriundo de diferentes vias bioquímicas, expressas diferencialmente de acordo com fatores nutricionais e condições de crescimento do microrganismo. Geralmente, as glioxial oxidases (EC 1.2.3.5) são responsáveis pela maior parte do H₂O₂ produzido; outras enzimas, como glicose oxidases (EC 1.1.3.4), aril-álcool oxidase (EC 1.1.3.7) e superóxido dismutases (1.15.1.1.) podem também responder por frações significativas da produção de peróxido (EVANS *et al.*, 1994; POINTING, 2001).

O perfil catalítico da lignina peroxidase é apresentado na figura 6. O ciclo reacional é iniciado pela oxidação da enzima e do ferro contido no sítio ativo de Fe³⁺ para Fe⁴⁺ por parte do H₂O₂, gerando água e a enzima no seu estado oxidado, chamado composto I. Nesta condição, o álcool veratrílico ou outro substrato reduzem o composto I a composto II, forma da enzima que ainda apresenta Fe⁴⁺. Uma segunda redução por um elétron, efetuada por um substrato que pode ser novamente o álcool veratrílico, retorna a enzima ao seu estado nativo. O excesso de H₂O₂, associado à ausência de um substrato redutor ocasionam a oxidação do composto II a composto III, forma inativa da enzima (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; SILVA, GOMES, 2004; POINTING, 2001).

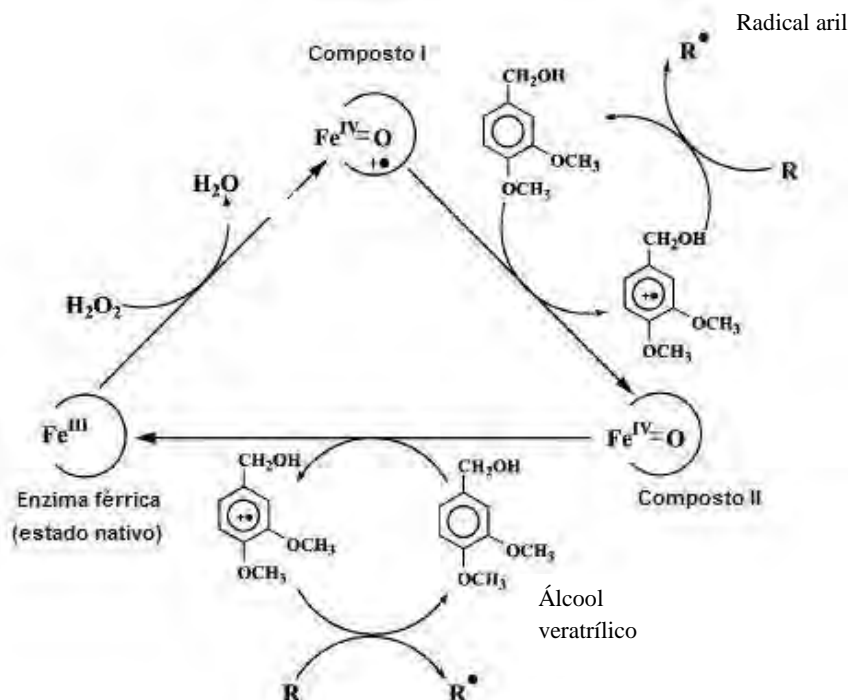


FIGURA 6. Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). (CAMERON, TIMOFEEVSKI, AUST, 2000).

Uma das peculiaridades das lignina peroxidases em relação a outras peroxidases é a sua capacidade de oxidar substratos aromáticos não fenólicos, produzindo radicais catiônicos arílicos que convergem para oxidações de alcoóis benzílicos, clivagem de ligações carbono-carbono, hidroxilações, demetilações, abertura de anéis aromáticos e dimerizações ou polimerizações entre fenóis (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; PONTING, 2001). O álcool 3,4-dimetoxibenzílico ou álcool veratrílico (VA), produzido e secretado por muitos fungos ligninolíticos, pode atuar como co-substrato; oxidado pela LiP, conduz oxidações monoelétrônicas em núcleos aromáticos não fenólicos, originando radicais catiônicos, capazes de atuar em oxidações não enzimáticas posteriores. O álcool veratrílico desempenha ainda funções como indutor da enzima, além de estabilizá-la contra a inativação por níveis elevados de H_2O_2 no meio reacional (MESTER, JONG, FIELD, 1995; PONTING, 2001).

2.2.3. MANGENÊS PEROXIDASES

As peroxidases dependentes de manganês (MnP; EC 1.11.1.13) são encontradas apenas entre fungos basidiomicetos, e incluem hemoproteínas extracelulares, pequenas (38 – 62,5 kDa), glicosiladas e bastante semelhantes, em estrutura e função, às lignina peroxidases. No entanto, em oposição a estas últimas, com poucas exceções não desencadeiam transformações diretas em seus substratos; esta função é desempenhada por complexos Mn^{3+} - ácidos orgânicos, resultantes da oxidação do Mn^{2+} pela enzima (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; GILL, ARORA 2003).

As reações envolvendo quebras de ligações carbono – carbono e aril-alquílicas em compostos fenólicos e não fenólicos, resultantes da atividade das manganês peroxidases, são iniciadas pela transferência de dois elétrons do sítio ativo da enzima para o H_2O_2 , resultando no composto I oxidado, conhecido como complexo Fe^{4+} - oxoporfirina, com liberação de água. A seguir, o Mn^{2+} reduz o composto I a composto II e é liberado na forma de Mn^{3+} . Uma segunda redução do composto II por outro átomo de Mn^{2+} restitui a enzima à sua configuração nativa (figura 7). Como a lignina peroxidase, a MnP é suscetível à conversão ao composto III, forma cataliticamente inativa em presença de excesso de peróxido (HOFRICHTER, 2002; SILVA, GOMES, 2004).

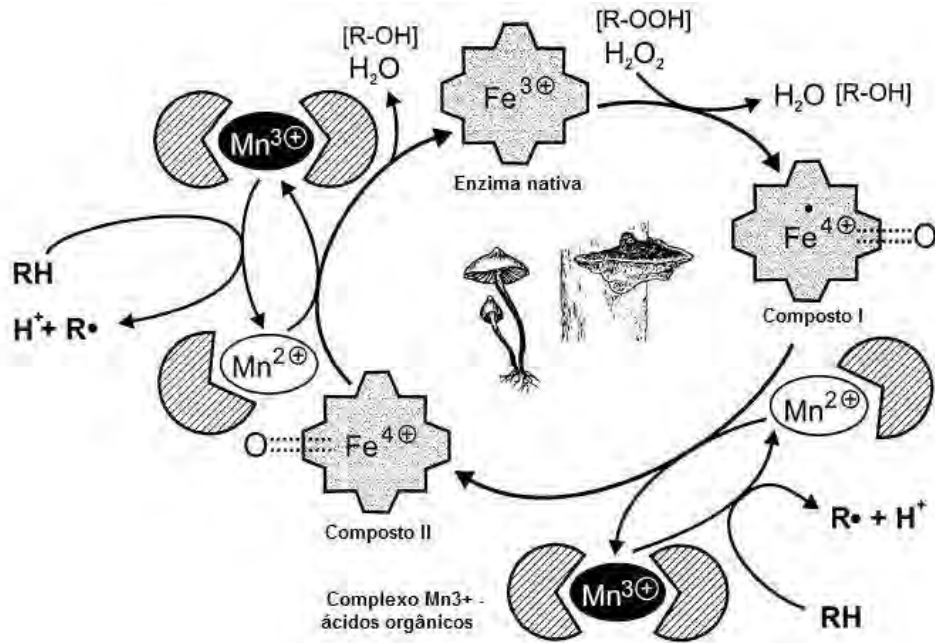


FIGURA 7. Ciclo catalítico das peroxidases dependentes de manganês (HOFRICHTER, 2002).

Os íons Mn^{3+} gerados durante o ciclo catalítico da MnP são quelados por ácidos orgânicos (oxalato, malonato, malato, lactato, tartarato), produzidos e secretados pelo próprio fungo. Estes complexos são os responsáveis por oxidações monoelétrônicas que originam radicais amino, fenoxi e aril-cátions, em presença de oxigênio molecular. A atuação de ácidos orgânicos e oxigênio na liberação de íons superóxido é uma das etapas que viabilizam a abertura de anéis aromáticos; os ânions superóxido reagem com radicais aril resultantes da ação de complexos Mn^{3+} / ácido orgânico. A formação de um éter-peróxido instável desencadeia fissão da estrutura aromática (figura 8). Alguns compostos orgânicos sulfurados e ácidos graxos insaturados também podem desempenhar papel importante, atuando como co-substratos, agindo sobre a lignina após conversão enzimática em radicais reativos (GIANFREDA, RAO, 2004; HOFRICHTER, 2002; SILVA, GOMES, 2004).

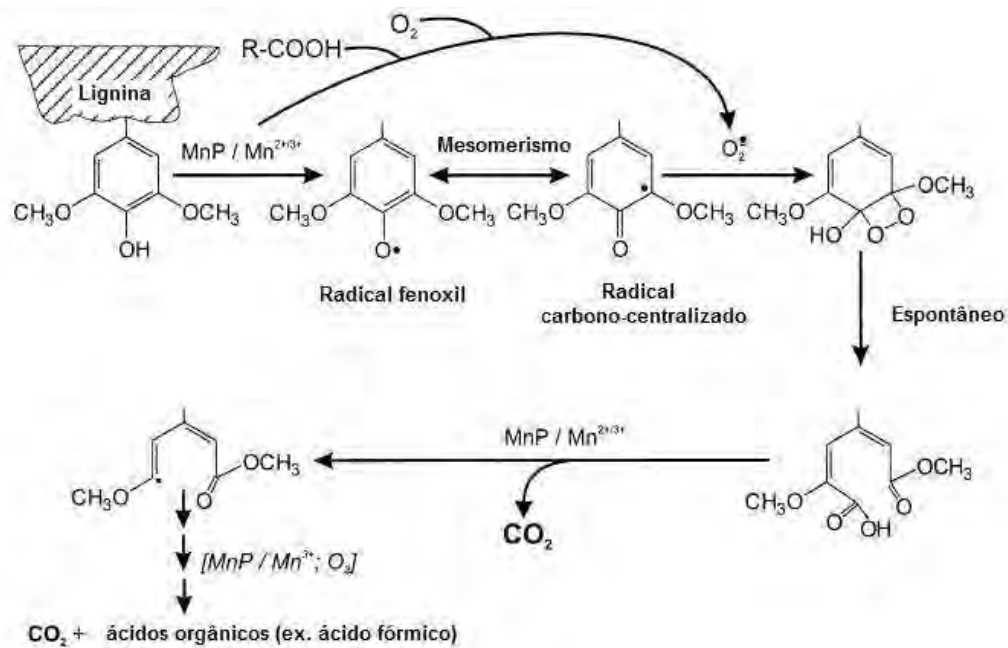


FIGURA 8. Representação de uma das possíveis vias de abertura do anel fenólico na lignina por ação de manganês peroxidases (HOFRICHTER, 2002).

2. 3. BIORREMEDIAÇÃO NO TRATAMENTO DE XENOBIÓTICOS

Os fenômenos associados à industrialização, revolução agrícola e expansão demográfica observados nas últimas décadas do século XX impuseram, em decorrência de todas as implicações ambientais associadas e suas conseqüências cada vez mais evidentes, a necessidade de manejo e tratamento dos resíduos gerados e por vezes acumulados em

diferentes compartimentos da biosfera. Muitos dos compostos químicos sintéticos tóxicos, associados a produtos e processos fundamentais das sociedades modernas, apresentam resistência à degradação biológica ou abiótica; pesticidas, solventes, combustíveis, corantes e explosivos, produzidos em quantidades expressivas nas últimas décadas, particularmente aqueles portadores de anéis aromáticos substituídos por halogênios, apresentam algum grau de recalcitrância (POINTING, 2001; RITTMANN, McCARTY 2001).

Frente às necessidades imediatas, o tratamento de resíduos perigosos passou a ser conduzido com base em métodos físico-químicos. Os mais difundidos incluem aterro e isolamento, incineração, sedimentação, filtração, separação por solventes e diálise (CAMERON, TIMOFEEVSKI, AUST, 2000; FREIRE *et al.*, 2000). Mais recentemente, novas e sofisticadas abordagens foram desenvolvidas, como a utilização de processos oxidativos avançados, ultra-som, ultrafiltração e osmose reversa para a contenção ou degradação de espécies químicas nocivas. Contudo, os recursos conhecidos, implementados ou ainda em avaliação, são bastante específicos quanto às condições de atuação e exibem limitada eficiência na eliminação de resíduos, gerando por vezes subprodutos com sérias propriedades toxicológicas; outra questão é o custo muitas vezes proibitivo para sua implementação (FREIRE *et al.*, 2000; MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004).

Alternativa aos processos tradicionais voltados ao tratamento de resíduos químicos e ambientes contaminados, a biorremediação consiste na utilização de organismos vivos ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas e polissacarídeos, por exemplo) como agentes de transformação química. À medida que se reconhecem a ecologia e rotas metabólicas importantes para a segurança e eficiência dos processos, desde seu planejamento até a conclusão, a biorremediação se consolida como recurso para recuperação ambiental (GIANFREDA, MORA, DIEZ, 2006).

As principais vantagens da biorremediação, cujos agentes geralmente são plantas e microrganismos, incluem: o custo reduzido de implementação e operação; a minimização na geração de subprodutos e a possibilidade de tratamento dos resíduos *in situ*, dispensando procedimentos de remoção caros e arriscados, além de possibilitar a manutenção da estrutura do solo, que não precisa ter suas camadas superficiais removidas (EERD *et al.* 2003; GIANFREDA, RAO, 2004; MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004).

A capacidade degradativa da microbiota autóctone define a estratégia adotada para biorremediação; se o ambiente contaminado contém organismos metabolicamente ativos sobre o xenobiótico, alterar propriedades físico-químicas do meio (teor de nutrientes, umidade) pode ser suficiente para estimular a atividade microbiana e acelerar o processo de atenuação natural, que envolve a biodegradação intrínseca protagonizada por microrganismos nativos. Este processo é conhecido como bioestimulação (GIENFREDA, MORA, DIEZ, 2006). Quando a microbiota original é pobre, ou a ocorrência da contaminação reduziu e alterou a população microbiana, é implementada a bioaugmentação; microrganismos com reconhecida capacidade de descontaminação são introduzidos, acompanhando modulação das variáveis físico-químicas do ambiente se necessário. Privilegia-se a utilização de microrganismos nativos da região, o que evita eventuais impactos resultantes da introdução de espécies exóticas (POINTING, 2001; RITTMANN, McCARTY, 2001; VOGEL, 1996).

Grande parte dos estudos voltados à biorremediação e à atenuação natural têm como foco a atuação de bactérias sobre compostos tóxicos (CULLINGTON, WALKER, 1999; MANDELBAUM, ALLAN, WACKETT, 1995; ROQUE, MELO, 2000; SØRENSEN, RONEN, AAMAND, 2001) . Geralmente as linhagens fisiologicamente capacitadas utilizam os poluentes orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio, ou seja, a degradação é associada ao metabolismo primário. A biotransformação e consumo de um determinado composto por uma espécie bacteriana são dependentes de vias bioquímicas específicas que envolvem a ação

de hidrolases, resultando em altas taxas de degradação, mas também em elevada especificidade; são passíveis de metabolização apenas uma ou poucas moléculas determinadas (POINTING, 2001; RITTMANN, McCARTY, 2001).

Nem todas as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos têm atuação tão restrita quanto as hidrolases bacterianas. Alguns sistemas enzimáticos, principalmente as oxidorreduções intra e extracelulares, apresentam ação mais generalizada, reconhecida sobre uma vasta gama de moléculas pertencentes a classes químicas não relacionadas. As oxidorreduções intracelulares, com destaque para o sistema citocromo P450, são responsáveis por reações de detoxificação de compostos que atingem o interior da célula e defendem o organismo do stress tóxicológico; são ubíquas entre microrganismos, plantas e animais (EERD *et al.*, 2003). Mas o maior potencial para biorremediação reside nas enzimas extracelulares, que podem ser aplicadas em condições que não permitam o estabelecimento do organismo produtor e atuar sobre moléculas não internalizadas pelas células. Tais enzimas, predominantemente microbianas, incluem hidrolases, peroxidases e polifenol oxidases. Estas duas últimas classes de enzimas formam a base do sistema ligninolítico oxidativo, são produzidas em grandes quantidades por fungos basidiomicetos e inúmeras pesquisas reforçam seu potencial de aplicação biotecnológica (DURÁN, ESPOSITO, 2000; GIANFREDA, RAO, 2004).

2. 3.1. POTENCIAL DOS FUNGOS BASIDIOMICETOS E ENZIMAS LIGNINOLÍTIICAS EM BIORREMEDIAÇÃO

A produção e secreção de enzimas extracelulares dependem, em geral, de fatores relacionados ao seu papel fisiológico, sendo afetados pela composição do meio de cultura, pH, relação carbono/nitrogênio, temperatura, aeração e presença de substrato ou indutores específicos (IKEHATA, BUCHANAN, SMITH, 2004). Muitos autores sustentam que a produção das ligninases ocorre durante o metabolismo secundário, e o fator preponderante na regulação da sua expressão é a disponibilidade de nitrogênio no meio de crescimento (TEKERE, ZVAUYA, READ, 2001). Entretanto, outros trabalhos têm mostrado que a síntese de cada uma das três principais enzimas despolimerizantes de lignina, lacase, manganês peroxidases e lignina peroxidases, é influenciada por fatores distintos e independentes; nem sempre a limitação de nitrogênio, por exemplo, é um requisito fundamental para sua expressão. Íons, como o Mn^{2+} e o Cu^{2+} , já foram citados como indutores de lacases (SWAMY, RAMSAY, 1999; TEKERE, ZVAUYA, READ, 2001). Fatores tão diversos como a presença de álcool veratrílico, detergentes como o tween 20 e tween 80, íons, compostos fenólicos de diferentes naturezas – incluindo pesticidas, corantes e solventes - são mencionados na literatura como indutores ou repressores da produção de enzimas em várias espécies fúngicas (MOUGIN, KOLLMANN, JOLIVALT, 2002).

Predominantes no sistema ligninolítico de fungos basidiomicetos, as peroxidases e fenoloxidasas extracelulares são sintetizadas e secretadas de maneira constitutiva ou estimulada por deficiências nutricionais, prevalentes nos ambientes contaminados. Inúmeros

estudos atestam a eficiência destas enzimas na degradação de xenobióticos *in vitro* e *in situ* (CASTILLO *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2002; MATHEUS, BONONI, MACHADO, 2000).

A atuação das lacases sobre compostos tóxicos têm sido freqüentemente reportada, e a lista de substâncias suscetíveis de modificação por parte das enzimas inclui hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHAs), organofosforados, clorofenóis, pesticidas, corantes e resíduos da produção de polpas celulósicas contendo alto teor de lignina (DURÁN, ESPOSITO, 2000; MINUSSI, PASTORE, DURÁN, 2007; POINTING, VRJIMOED, 2000; REZENDE *et al.*, 2005; SWAMY, RAMSAY, 1999). A viabilidade do uso das lacases como agentes de biorremediação se deve a fatores como a estabilidade extracelular das enzimas; a possibilidade de atuação, dependendo do substrato de interesse, sem a necessidade de cofatores como peróxido de hidrogênio, necessário à ação das peroxidases; e a facilidade da produção em larga escala subsidiada por resíduos lignocelulósicos (BALDRIAN, 2006. IKEHATA, BUCHANAN, SMITH, 2004).

Dentre as peroxidases, o elevado potencial de oxidorredução observado para as lignina peroxidases, aliado à relativa inespecificidade em relação aos possíveis substratos, e capacidade de oxidação de estruturas não-fenólicas tornam estas enzimas ferramentas importantes na biodegradação de compostos tóxicos (GIANFREDA, RAO, 2004). Manganês peroxidases são também apontadas como responsáveis pela degradação de fluoreno em estudos em solo (BOGAN *et al.*, 1996), e dos herbicidas bentazon e MCPA, ácido-4-cloro-2-metilfenoxiacético (CASTILLO *et al.*, 2001). Em algumas situações, uma das enzimas pode ser mais apropriada para aplicação e / ou é produzida em maiores níveis pelo microrganismo; dependendo do caso, a atuação cooperativa entre elas e com outras enzimas gera melhores resultados (DURÁN, ESPOSITO, 2000).

Além da capacidade de síntese das oxidoredutases ligninolíticas, outras razões que fazem dos fungos basidiomicetos candidatos preferenciais nas aplicações de biorremediação

incluem: sua capacidade de crescer sobre resíduos agroindustriais, viabilizando a produção massiva de inóculo a baixo custo; sua natureza filamentosa, que lhes confere a resistência necessária para colonizar extensivamente um ambiente e manter-se nele; a resistência a altos níveis de contaminação e a condições de atividade de água mais restritivas do que as que seriam suportadas por bactérias (GIANFREDA, RAO, 2004; MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004).

A seleção dos fungos por vezes é feita com base na sua capacidade de descoloração de corantes sintéticos, como o Poli-R-478, considerada como estimativa do potencial ligninolítico; contudo, esta abordagem tem se mostrado freqüentemente insatisfatória (BENDING, FRILOUX, WALKER, 2002; RABINOVICH, BOLOBOVA, VASIL'CHENKO, 2004). A avaliação detalhada do metabolismo microbiano diante dos contaminantes, desde seu potencial de crescimento sob concentrações elevadas dos xenobióticos até o monitoramento dos possíveis metabólitos gerados, a fim de garantir que houve redução da toxicidade, são essenciais para garantir a efetividade das estratégias de biorremediação antes mesmo da sua implantação (MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004).

Nos moldes tecnológicos disponíveis, a aplicação de enzimas livres em ambientes contaminados ainda não é factível. O custo de produção, isolamento e a pouca estabilidade das proteínas nos solos sugerem que para remoção efetiva do poluente é necessária a introdução do microrganismo produtor da enzima de interesse no sítio contaminado (GIANFREDA, RAO, 2004). Embora não seja por si indicativo da capacidade de transformação pelo microrganismo, a resistência ao xenobiótico é um dos pré-requisitos básicos para sua utilização em processos de biorremediação; o crescimento diante de elevadas concentrações do composto tóxico revela se o microrganismo dispõe de capacidade de se estabelecer com sucesso no material ou ambiente contaminado (BONONI, 1998; MEYSAMI, BAHERI, 2003; RIGAS *et al.*, 2003; VOGEL, 1996). Dessa forma, a seleção de cepas com

elevada capacidade de produção de enzimas, assim como, a obtenção de enzimas tolerantes às condições ambientais específicas, são etapas importantes no processo de biorremediação.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Selecionar, dentre fungos basidiomicetos isolados na região do Noroeste Paulista, linhagens tolerantes aos herbicidas aplicados cultura de cana de açúcar, atrazina e diurom e avaliar seu potencial para a degradação destes poluentes.

3.2. ESPECÍFICOS

- Determinar a tolerância e capacidade degradativa *in vitro* dos fungos sob diferentes concentrações dos herbicidas atrazina e diurom, observando crescimento em meios sólido e líquido ;
- Avaliar a produção de ligninases ao longo do cultivo dos fungos, e a influência da presença dos herbicidas sobre o desenvolvimento e síntese das enzimas;
- Caracterizar as enzimas produzidas em altos níveis quanto a pH e temperatura ótimos de atividade, bem como termoestabilidade, a fim de estimar seu potencial de aplicação em diferentes condições de tratamento biológico envolvendo as substâncias estudadas;

- Estimar, por meio de análises cromatográficas, as taxas de desaparecimento dos princípios ativos do herbicida, tanto nas culturas como em sistemas de reação *in vitro*, empregando as condições físico-químicas ótimas para atuação das enzimas encontradas.
- Verificar o papel das enzimas ligninolíticas de degradação dos herbicidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS

Foram selecionadas cepas de basidiomicetos dentre aquelas isoladas em projetos anteriores (SANTOS *et al.*, 2004, ABRAHÃO *et al.*, 2008), conservadas em cultura pura, em meio BDA, no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Unesp / IBILCE - Campus de São José do Rio Preto. Treze linhagens foram testadas quanto à sua resistência a atrazina: *Gloeophyllum striatum* (Sw.:Fr.) Murrill (isolados MCA 2 e MCA 7), *Datronia caperata* (Berk.) Ryv. (MCA 5), *Trametes modesta* (Berk.) Ryv. (MCA 6), *Polyporus tenuiculus* (Beauv.) Fr. (MCA 9 e MCA 11), *Pycnoporus sanguineus* (L.:Fr.) Murrill (MCA 16), *Dacryopinax elegans* (Berk.) G.W. Martin (SXS 323), *Pluteus cubensis* (Murril) (SXS 320), uma espécie de Agaricales não identificada (MCA 17), *Polyporus* sp. MCA 128, *Hexagonia hirta* (Beauv.: Fr.) Fr. MCA 131 e *Datronia stereoides* (Fr.) Ryv. MCA 167. Para o diurom foram testadas as mesmas cepas, exceto *Pluteus cubensis* SXS 320. As culturas foram mantidas por repiques sucessivos, através da transferência de porções do micélio para placas de petri contendo meio BDA (Oxoid), mantidas em incubadora tipo B.O.D. a 28°C por 10 a 15 dias, e então armazenadas em câmara fria a 4°C até a utilização.

4.2. HERBICIDAS

Os ensaios foram realizados com formulações comerciais dos herbicidas. O diurom, Karmex[®] (Du Pont), apresentava-se em formulação de grânulos dispersáveis em água contendo 80,0% (m/m) de princípio ativo 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia. A atrazina utilizada consistiu de suspensão concentrada produzida pela Nortox e comercializada com o nome Atrazina Nortox 500 SC com 50,0% m/v do princípio ativo, 2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-1,3,5-triazina. Para as análises em HPLC foram utilizados padrões analíticos Sigma (atrazina, 98% de pureza) e UltraChem (diurom, 99% de pureza).

4.3. SELEÇÃO DAS CEPAS TOLERANTES AOS HERBICIDAS

Foi avaliado o crescimento dos microrganismos em placas de Petri de 90 mm contendo meio BDA e duas concentrações de cada herbicida, a fim de selecionar as espécies tolerantes à presença de concentrações elevadas dos xenobióticos estudados. Tais concentrações foram estipuladas com base nas concentrações média e máxima do princípio ativo nas caldas preparadas para aplicação em campo, conforme recomendação das bulas dos produtos. Os herbicidas foram adicionados em condições assépticas ao meio BDA ainda liquefeito, após esterilização. O diurom, adquirido como formulação granulada, foi

primeiramente diluído e homogeneizado em água destilada estéril, e então adicionado ao meio de cultura resultando nas concentrações finais de 12,80 g.l⁻¹ e 20,48 g.l⁻¹. A atrazina foi diretamente diluída no meio, até as concentrações de 6,25 g.l⁻¹ e 10 g.l⁻¹. O meio BDA, sem os pesticidas, foi usado como controle.

Após solidificação do meio, discos de 6 mm de diâmetro foram cortados e removidos do centro das placas com auxílio de tubos de ensaio estéreis. O inóculo foi feito substituindo estas porções de meio por discos de tamanho equivalente, obtidos de regiões de crescimento ativo dos microrganismos em placas com BDA sem o herbicida. O crescimento dos fungos foi aferido diariamente com régua, em 4 pontos equidistantes do centro do inóculo, para determinação da extensão total da colônia, velocidade de crescimento (centímetros / dia) e taxa de inibição do crescimento dos tratamentos em relação ao controle. Os resultados foram expressos como a média de três repetições do experimento. As culturas foram acompanhadas por até 15 dias, e aspectos como o adensamento micelial (fracamente adensado, medianamente adensado e fortemente adensado, com pontuações respectivas de 1, 2 e 3), alterações morfológicas e dados de crescimento / inibição foram ponderados conjuntamente na avaliação da resposta dos fungos à presença dos herbicidas no meio. As duas cepas consideradas mais resistentes para cada herbicida foram selecionadas para estudos de produção de enzimas ligninolíticas e do papel das mesmas na degradação dos xenobióticos.

4. 4. PRÉ-INÓCULO

O inóculo para a fermentação em meio líquido foi obtido por raspagem da superfície das culturas em placa de petri com auxílio de um bisturi, transferindo os fragmentos do micélio para o meio de Kirk *et al.* (1978) com algumas modificações, suplementado com 1% de glicose e 0,1% de NH_4NO_3 . A composição do meio de cultura é dada a seguir:

KH_2PO_4	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
CaCl_2	0,01 g
Solução mineral	1 ml
Solução de vitaminas	0,5 ml
Água destilada q.s.p.....	1000 ml
pH 6,0	

Solução mineral:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,0 g
NaCl	1,0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g

Material e métodos

CoCl ₂	0,1 g
CaCl ₂	0,82 g
ZnSO ₄	0,1 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,1 g
AlK(SO ₄) ₂	0,01 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
NaMoO ₄	0,01 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Solução de vitaminas:

Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Piridoxina	0,010 g
Cianocobalamina	0,0001 g
Ácido nicotínico	0,005 g
DL Pantotenato de cálcio	0,005 g
Ácido p-aminobenzóico	0,005 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Após 6 dias de cultivo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, o meio foi drenado (escorrido), o micélio lavado duas vezes com tampão de Knapp (TIXIER *et al.*; 2000, descrito abaixo) e triturado. A suspensão de células teve a D.O. ajustada para 0,5 a 550nm por diluição também com tampão de Knapp, e então utilizada como inóculo nos experimentos, utilizando 1 ml da suspensão para cada frasco contendo 25 ml de meio.

Tampão de Knapp

KH_2PO_41 g

K_2HPO_41 g

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$0,004 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,04 g

pH 6,6

4. 5. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO E PRODUÇÃO DAS ENZIMAS

Os cultivos em meio líquido foram conduzidos em frascos de 125 ml, contendo 25 ml de meio de Kirk *et al.* (1978), descrito no item 4.4, a pH 6,0, inoculados com 1 ml da suspensão de micélio descrita no item 3.5, e incubados em BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro.

Decorrido o tempo de cultivo, os meios foram filtrados com papel de filtro Whatman nº1, a vácuo. O papel filtro contendo a biomassa e previamente tarado, foi seco em estufa a 70°C até peso constante para aferição gravimétrica da biomassa e o filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 10000 g a 4°C. O sobrenadante coletado foi utilizado como extrato enzimático bruto e mantido em banho de gelo para as dosagens enzimáticas e determinações analíticas.

4. 6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

4. 6. 1. LACASE

A atividade das lacases nos extratos enzimáticos foi determinada utilizando metodologia descrita por Buswell, Cai, Chang (1995), baseada na oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'-azino-bis-etilbentiazolina). A mistura de reação foi composta por 0,9 ml de tampão acetato de sódio 10 mM em pH 3,5 contendo 0,03% de ABTS. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml da solução enzimática apropriadamente diluída; após incubação por 1 minuto a 40°C, foi realizada a leitura do ensaio a 420nm.

O branco consistiu do sistema de reação descrito acima, substituindo o extrato enzimático por água destilada, e os controles para cada extrato enzimático, de misturas de reação que omitiam o substrato ABTS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida

como a quantidade de enzima que oxida 1 μ mol de ABTS por minuto, considerando ϵ para o ABTS oxidado de $3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4. 6. 2. MANGANÊS PEROXIDASES (MNP)

As dosagens de peroxidases dependentes de manganês foram realizadas por meio de misturas de reação contendo:

- 0,8ml de tampão lactato de sódio 50 mM pH 4,5;
- 0,1 ml de solução de MnSO_4 a 400 mM;
- 4 μ l de H_2O_2 a 10mM;
- 0,1 ml da solução enzimática bruta, diluída em água destilada se necessário.

A reação foi incubada por 10 minutos a 40°C, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 240 nm (GLENN, AKILESWAREAN, GOLD, 1986). O branco para estes ensaios foi preparado substituindo o extrato bruto por igual volume de água destilada, enquanto os controles para cada extrato enzimático foram feitos substituindo o MnSO_4 nas misturas de reação descritas por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μ mol de Mn^{3+} por minuto, utilizando um ϵ de $8,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o Mn^{3+} (AITKEN, IRVINE, 1990).

4. 6. 3. LIGNINA PEROXIDASES (LIP)

Os ensaios para determinação de lignina peroxidases no meio de cultura forma realizados incubando, por 10 minutos, a 40°C (TIEN, KIRK, 1988):

- 0,8 ml de tampão tartarato de sódio 50 mM pH 3,0;
- 0,1 ml de solução de álcool veratrílico a 40 mM;
- 4 µl de H₂O₂ 100mM;
- 0,1 ml de solução enzimática bruta;

O branco foi composto da mistura de reação conforme descrita substituindo o extrato enzimático por água destilada; os controles para cada extrato enzimático foram feitos substituindo o substrato álcool veratrílico por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1µmol de álcool veratrílico a veratraldeído por minuto por litro de extrato enzimático, considerando $\epsilon_{310\text{nm}} = 9,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o veratraldeído.

4. 7. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS HERBICIDAS

Soluções do diurom e da atrazina foram diluídas em metanol ($12,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), homogeneizadas por dois pulsos de sonicação de 15 minutos, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 25°C e esterilizadas por filtração em membrana Millipore com poro de $0,2 \mu\text{m}$. Alíquotas foram dispensadas, em condições assépticas, em frascos de 125 ml previamente esterilizados. Após evaporação do solvente, cada frasco recebeu 25 ml de meio líquido (KIRK *et al.*, 1978) contendo 0,1% de NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio, resultando em concentrações finais nos meios de cultura de 5, 10, 25 e 50 mg.l^{-1} , com base no princípio ativo. Os meios foram então inoculados com 1 ml de suspensão de células em tampão Knapp, com D.O. de 0,5 a 550 nm (o que representa uma biomassa de cerca de 0,52 mg). As culturas foram mantidas por 20 dias em BOD a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Além da presença dos herbicidas, foram também avaliados os efeitos de fontes de carbono alternativas no meio de cultivo. Para os meios contendo 1% de bagaço de cana, o bagaço foi disposto nos frascos antes da autoclavagem; quando a fonte de carbono foi a glicose a 1%, esta foi solubilizada no meio de cultura antes da esterilização.

4. 8. CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Os meios foram preparados conforme descrito no item 4.5, suplementados com 1% de glicose e 0,1% de NH_4NO_3 , e contendo ou não 25 mg.l^{-1} do herbicida. Dois frascos, um sem diurom e outro contendo o herbicida foram retirados a cada 4 dias, por até de 40 dias. Meios contendo apenas diurom como fonte de carbono também foram preparados, e mantidos por até 20 dias. Além das dosagens enzimáticas, alíquotas do meio de cultura foram reservadas em tubos de 2 ml após centrifugação e congelados, para posterior determinação cromatográfica da taxa de degradação do diurom. Aos 20 e 40 dias, alguns micélios de frascos contendo glicose e diurom também foram congelados, para extração do diurom e análise da adsorção do pesticida. Os resultados expressam as médias de três repetições do experimento.

4.9. EFEITO DAS FONTES DE CARBONO E MOLÉCULAS INDUTORAS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Os meios de cultura, preparados conforme o item 4.5, continham glicose, bagaço de cana e farelo de trigo a 1% como fontes de carbono. Outros fatores de indução como álcool veratrílico (ARORA, GILL, 2001b), Mn^{2+} (TEKERE, ZVAUYA, READ, 2001) e folhas torradas de mate (*Ilex paraguayensis*) também foram testados, bem como a própria

deficiência de nitrogênio enquanto condição de crescimento. Os meios insuficientes em nitrogênio foram preparados reduzindo a concentração inicial de NH_4NO_3 no meio de 1 para $0,1 \text{ g.l}^{-1}$, o que corresponde a uma redução de 25 para 2,5 mM de nitrogênio disponível. O Mn^{2+} , em concentração final de 20 ppm, foi adicionado na forma de MnSO_4 , e o chá mate em concentração de 0,2% no meio de cultura. Já o álcool veratrílico, utilizado na concentração de 0,5 mM, foi adicionado a partir de uma solução estoque a 500 mM, esterilizada por filtração.

4. 10. EFEITO DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS LACASES

Para determinação do pH ótimo de atividade, foram realizados ensaios conforme descrito no item 4.6.1, substituindo o tampão acetato de sódio rotineiramente utilizado por tampão citrato a 100 mM pH 2,0 e tampão de McIlvaine, na faixa de pH entre 2,5 e 8,0.

Foi também determinada a estabilidade da enzima em ausência do substrato nestes pHs, por meio da incubação de 0,1 ml da enzima com 0,4 ml de cada um dos tampões à temperatura de 25°C. Após 24 horas, a atividade residual em cada condição foi determinada realizando ensaio nas condições ótimas de atividade.

A temperatura ótima foi determinada realizando os ensaios descritos no item 4.6.1, utilizando tampão citrato de sódio a 100 mM e pH 2,5, e variando a temperatura de incubação da mistura de reação entre 25 e 80°C.

A estabilidade das enzimas em diferentes temperaturas, quando em ausência do substrato, foi determinada mantendo a solução enzimática por até 60 minutos nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60°C, sendo verificada a atividade residual das alíquotas retiradas após 5, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos de incubação, por meio de ensaio padrão realizado nas condições ótimas.

4.11. ENSAIO PARA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DOS HERBICIDAS

A análise do potencial de degradação da atrazina e do diurom pelas lacases fúngicas *in vitro* foi realizada em uma mistura de reação que consistiu em 800 µl da solução do herbicida a 25 mg.l⁻¹ (concentração final de 20 mg.l⁻¹), 100µl de tampão acetato de sódio 500 mM pH 2,5 contendo 0,3% de ABTS (concentração final de 0,03%) e 100 µl da solução enzimática. Esta foi previamente tratada por 15 minutos com 24,5 U/ml de solução de catalase bovina (Sigma) a fim de remover o peróxido de hidrogênio eventualmente presente e evitar a possível interferência de peroxidases.

Os ensaios foram conduzidos por até 24 horas, nas condições de pH e temperatura ótimas para atuação das enzimas. Após remoção das alíquotas da reação, estas foram acondicionadas em tubos de 1,5 ml e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido (-196°C). Como controles, foram incluídas reações sem o mediador ABTS, reação em pH 7,0, ou ainda em ausência da enzima ou do diurom. As alíquotas foram posteriormente descongeladas, filtradas em membrana de 0,22 µm e analisadas em HPLC, conforma descrito no item 4.12.

4.12. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PARA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS PELOS FUNGOS

Os produtos de uma possível degradação do diurom pelos fungos foram avaliados em HPLC Jasco, equipado com detector UV-975 e software StarChromatography 4.0 Varian. As amostras guardadas na ocasião da retirada das culturas foram descongeladas, centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e filtradas em membrana de 0,22 μm antes da injeção no HPLC. Foram injetados 20 μl em coluna PerkinElmer C18 (250 mm x 4,6 mm; tamanho da partícula, 5 μm), contida em forno ajustado a 40°C, e as corridas duraram 10 minutos. A eluição isocrática foi realizada com fase móvel constituída de acetonitrila e água (60/40 v/v), com fluxo de 1 ml por minuto com detector ajustado a 240 nm, para os extratos contendo diurom; quando o analito era a atrazina, a eluição foi realizada com acetonitrila e água (55/45), e o detector foi ajustado para 220 nm.

Para determinação da fração do herbicida possivelmente adsorvida aos micélios, os mesmos foram macerados em tubos de ensaio com auxílio de bastão de vidro. Após extração por duas vezes com 500 μl de n-hexano, os sobrenadantes coletados foram acondicionados em novo tubo de ensaio, e as alíquotas combinadas deixadas evaporando em estufa a 45°C por uma noite. O resíduo foi ressuspensão em 1000 μl de fase móvel, filtrado em membrana de 0,22 μm e injetados no cromatógrafo como anteriormente descrito.

Para avaliação da atuação das lacases *in vitro*, em sistemas de reação contendo a enzima e ABTS como mediador, foi empregado aparelho de HPLC Dionex. As condições de análise foram as mesmas descritas acima, exceto pelo detector analisando simultaneamente 4

comprimentos de onda, para facilitar a observação de possíveis produtos de reação: 220, 240, 255 e 340nm.

A concentração dos herbicidas nas amostras foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com soluções dos mesmos em água destilada, em concentrações variando de 1 a 25 mg.l⁻¹. A curva de calibração para o diurom foi obtida usando diurom da UltraScientific, com 99% de pureza (apêndice B), e para atrazina, foi empregado o padrão analítico Sigma, com 98% de pureza (apêndice A). O procedimento analítico e operacional do HPLC para os padrões (coluna, fase móvel) seguiu aquele já descrito anteriormente para as amostras.

4.13. OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As dosagens de proteínas foram realizadas segundo método de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão. Açúcares redutores totais nos meios de cultura foram determinados utilizando ácido 3,5- dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1. SELEÇÃO DOS FUNGOS TOLERANTES AOS PESTICIDAS

A fim de selecionar as cepas resistentes aos herbicidas estudados neste trabalho, treze cepas fúngicas foram cultivadas em meio BDA contendo atrazina, e destas, doze foram testadas também para o diurom. Os pesticidas foram adicionados ao meio BDA nas concentrações máxima e média das caldas preparadas para aplicação em campo (dada pela dose, em gramas, aplicada por hectare, e o volume médio empregado para diluição): para a atrazina, de 6,25 g.l⁻¹ e 10,0 g.l⁻¹; e para o diurom, de 12,80 gl.⁻¹ e 20,48 g.l⁻¹.

As figuras de 9 a 21 mostram as curvas de crescimento obtidas a partir da colonização micelial do meio sólido em placa, resultantes do cultivo dos fungos em presença de atrazina. As linhagens MCA 131, MCA 167, SXS 323 e SXS 320 não apresentaram fase lag perceptível, mas para a maioria das demais a fase lag foi de 24 horas. Em presença do diurom, o crescimento de várias cepas só pôde ser observado com um atraso de 24 a 72 horas em relação ao controle (figuras 25 e 26); isto pode indicar uma adaptação fisiológica do microrganismo ao herbicida, seja para sua degradação ou imobilização na superfície externa da hifa (CARLILE, WATKINSON, GOODAY, 2001).

De uma maneira geral, o diurom exerceu efeitos mais severos sobre fungos do que a atrazina nas concentrações avaliadas (figuras 22 a 33); a menor concentração do diurom, 12,80 g.l⁻¹ provocou uma inibição média na extensão das colônias de 72%, com mínimo de

17,6% para *Dacriopynax elegans* SXS 323 e até 100% para a linhagem de Agaricales MCA 17 (tabela 3).

D. elegans mostrou-se bastante resistente ao diurom, sendo praticamente indiferente à concentração de 12,8g.l⁻¹ e pouco inibida na presença de 20,48 g.l⁻¹ do herbicida (figura 33).

A atrazina, na concentração de 10,0 g.l⁻¹, exerceu inibição média de 57,8%, com variação de 43% para *Pluteus cubensis* até 71,9% para a linhagem *Polyporus* sp. MCA 128 (tabela 2).

Além dos efeitos sobre o crescimento dos microrganismos, fatores de stress são reconhecidos por alterar o seu desenvolvimento de diversas maneiras, o que pode ser evidenciado como mudanças na forma de crescimento da colônia, na pigmentação e na esporulação (CARLILE, WATKINSON, GOODAY, 2001). Em trabalho de seleção de fungos tolerantes ao herbicida linuron, da classe das feniluréias, Wilkinson e Lucas (1969) observaram, além da inibição do crescimento, redução da esporulação e restrição da mesma a algumas áreas concêntricas em *Trichoderma viride* cultivado em meio BDA com 100 ppm do pesticida. Tais observações também devem ser levadas em conta durante a seleção do microrganismo, já que podem interferir na sua capacidade de colonização, sobrevivência e dispersão.

A maioria das linhagens estudadas no presente trabalho sofreu alterações de pigmentação quando na presença dos herbicidas. Essas alterações foram principalmente, clareamento das colônias (Figura 9, MCA 2, figura 28, MCA 16). Em alguns casos, houve a formação de um halo ao redor das colônias o qual pode ser interpretado como secreção de pigmento ou precipitação de algum composto; no caso do diurom, até mesmo produtos de polimerização de anilinas resultantes da modificação do herbicida (TRAVKIN *et al.*, 2002) (Figura 25, MCA 7). Outra anormalidade induzida pelos pesticidas foi referente ao adensamento micelial. Foi observada redução da densidade de hifas nas colônias na maioria

dos tratamentos, como em MCA 16 exposto à atrazina (figura 15); entretanto aumentos da densidade também foram registrados, como a linhagem MCA 2 crescendo sobre atrazina (figura 9). Adotado como indicativo do vigor micelial, associado à capacidade de colonização (PEDRA, MARINO, 2006), o adensamento micelial, além da velocidade e inibição do crescimento, constituíram os critérios de seleção dos fungos para as etapas subsequentes do trabalho. Contextualizando todos estes aspectos, as cepas *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 e *Dacryopinax elegans* SXS 323 foram escolhidas para os experimentos envolvendo o diurom; para a atrazina, as cepas selecionadas foram *Pluteus cubensis* SXS 320 e *Polyporus tenuiculus* MCA 11.

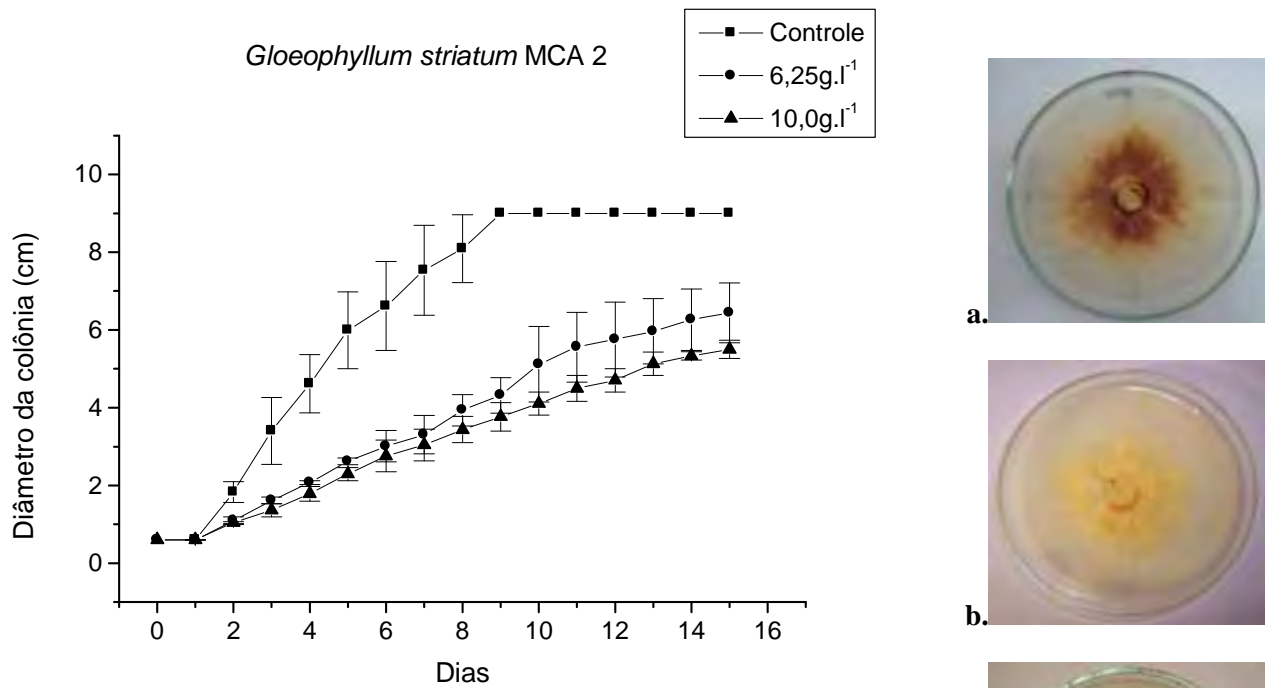


FIGURA 9. Curvas de crescimento de *Gloeophyllum striatum* MCA 2 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 6,25g.l⁻¹ e c: cultivo com 10,0g.l⁻¹

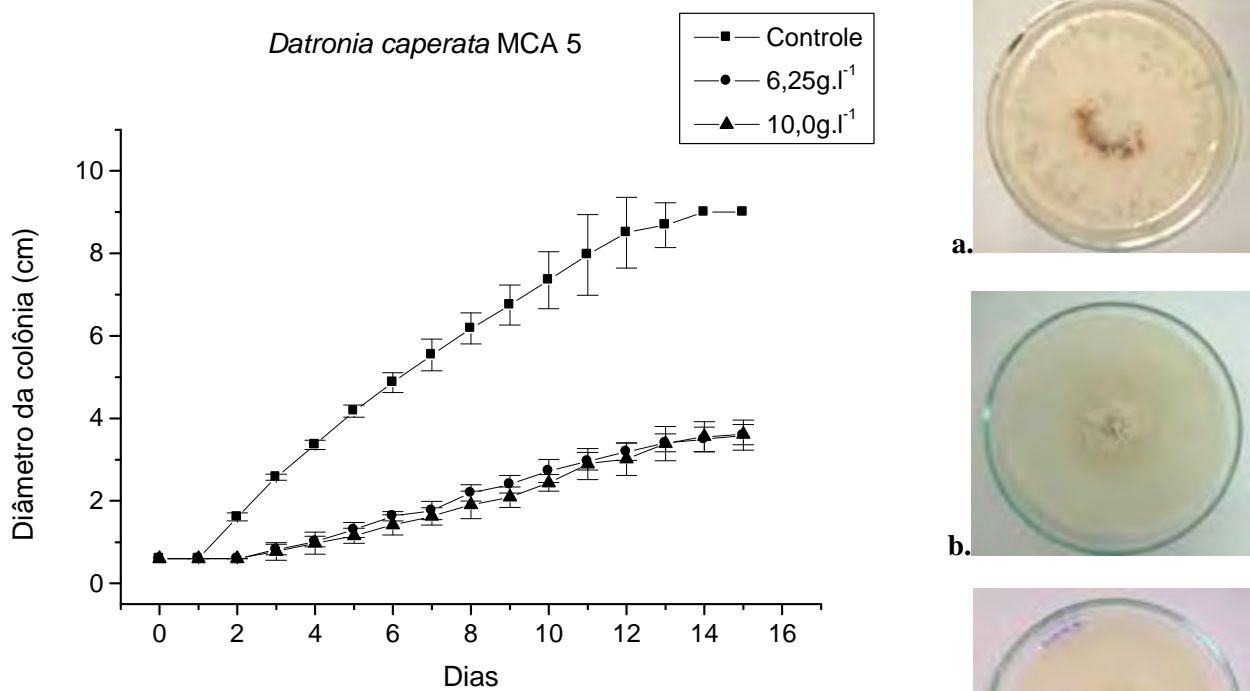


FIGURA 10. Curvas de crescimento de *Datronia caperata* MCA 5 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 6,25g.l⁻¹ e c: cultivo contendo 10,0g.l⁻¹ do pesticida.

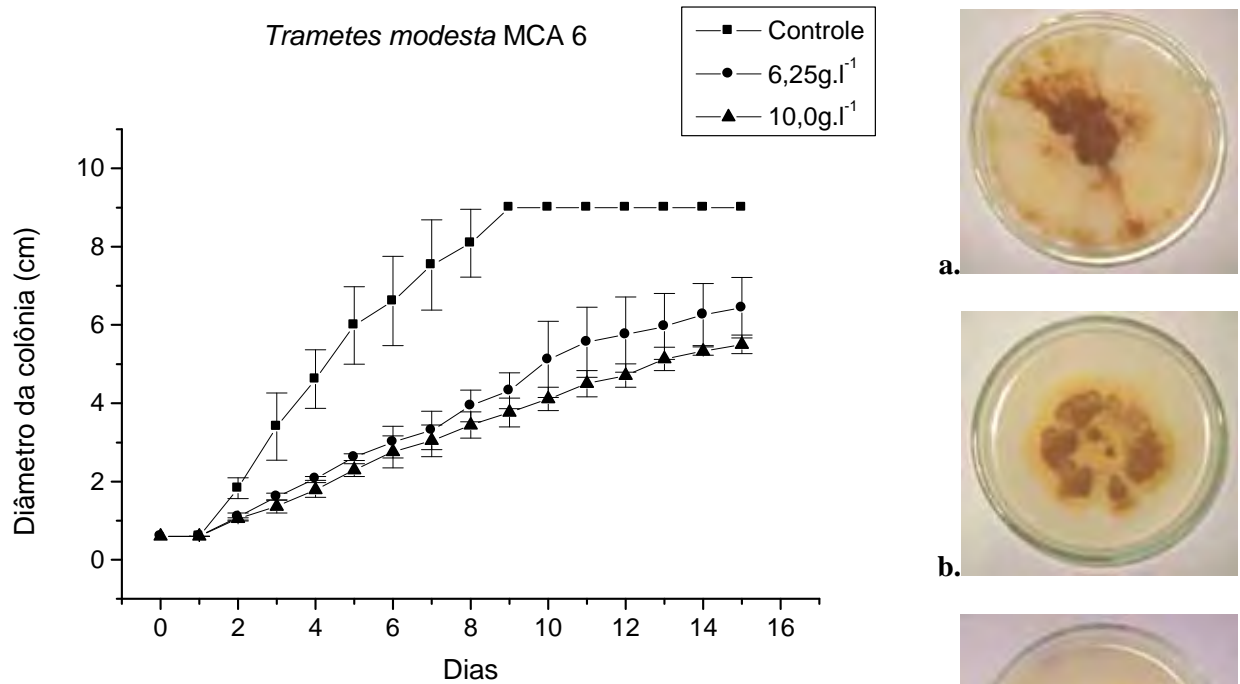


FIGURA 11. Curvas de crescimento de *Trametes modesta* MCA 6 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 6,25g.l⁻¹ ; c: cultivo com 10,0g.l⁻¹ .

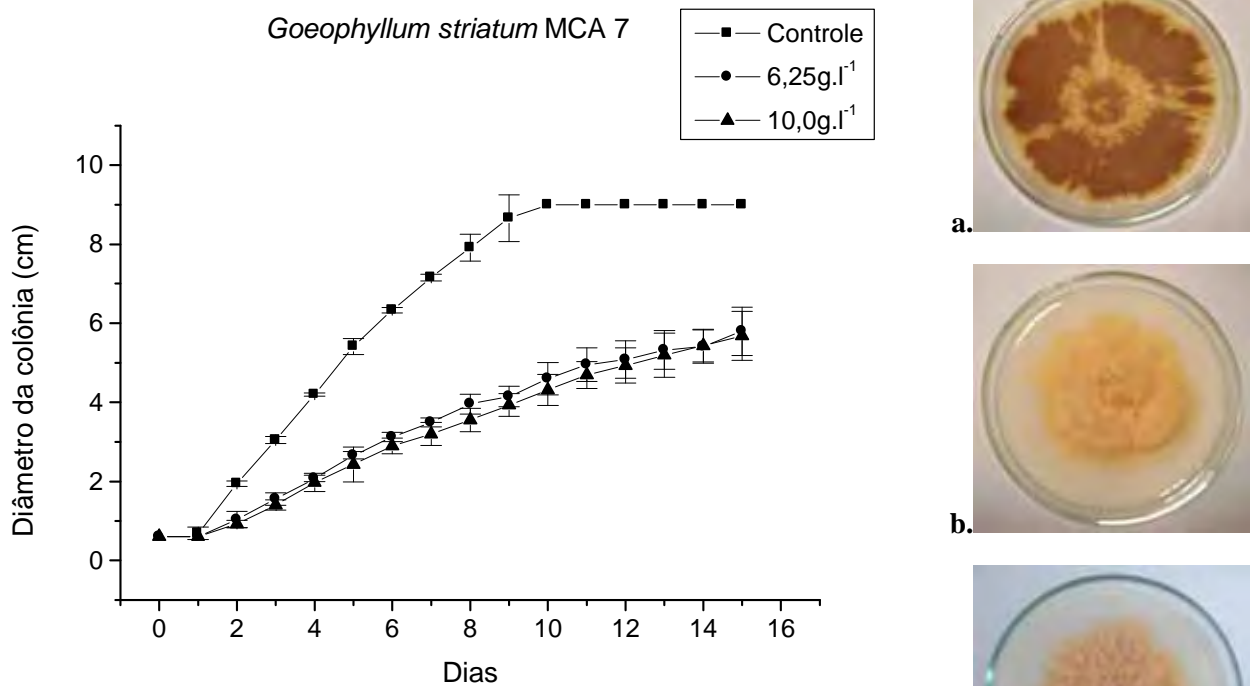


FIGURA 12. Curvas de crescimento de *Gloeophyllum striatum* MCA 7 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 6,25g.l⁻¹; c: 10,0g.l⁻¹ do pesticida.

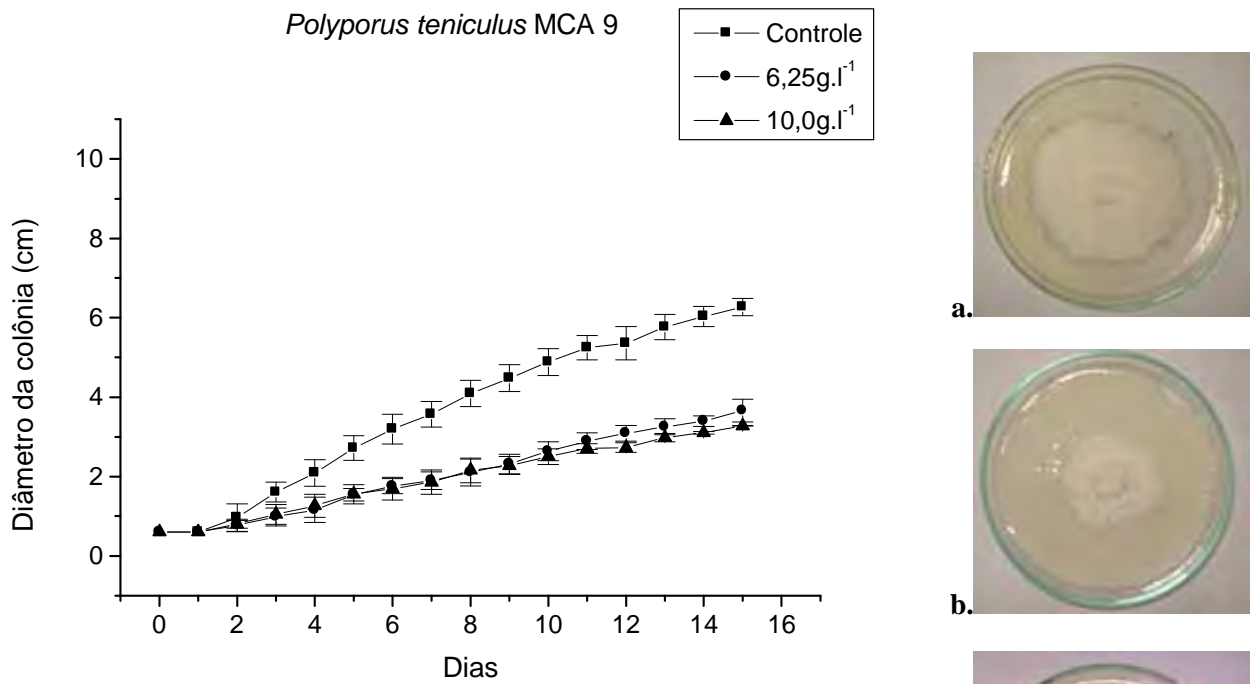


FIGURA 13. Curvas de crescimento de *Polyporus tenuiculus* MCA 9 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 6,25g.l⁻¹; c: 10,0g.l⁻¹ do pesticida.

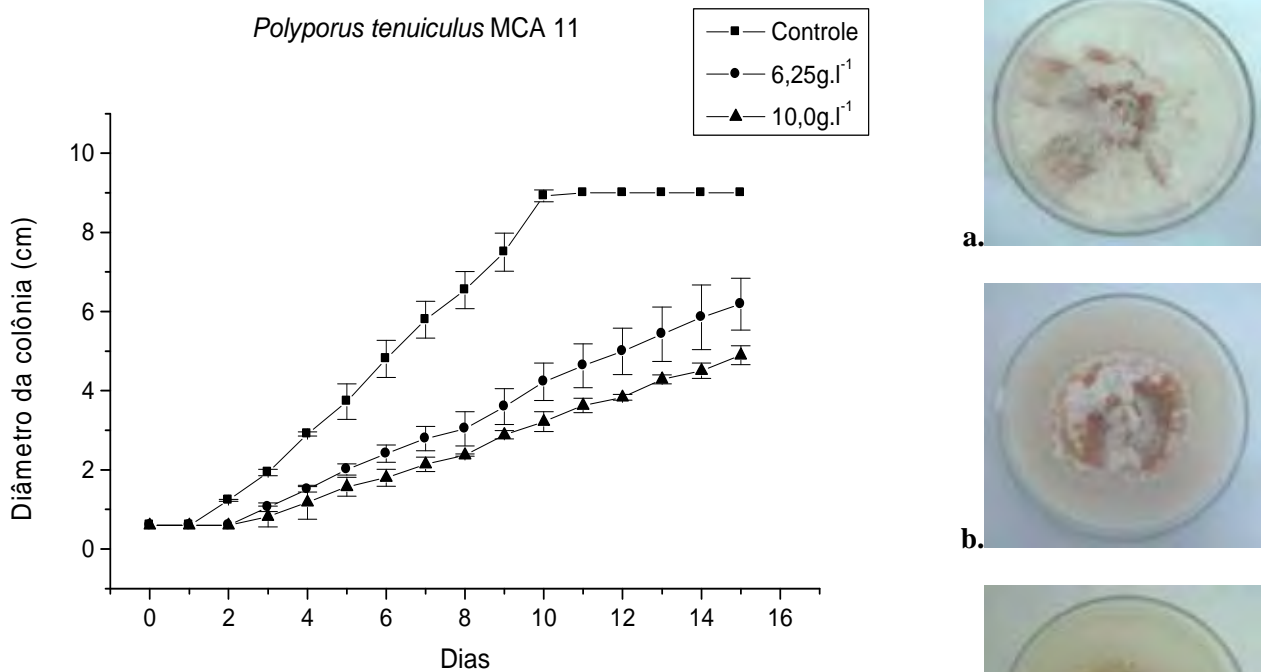
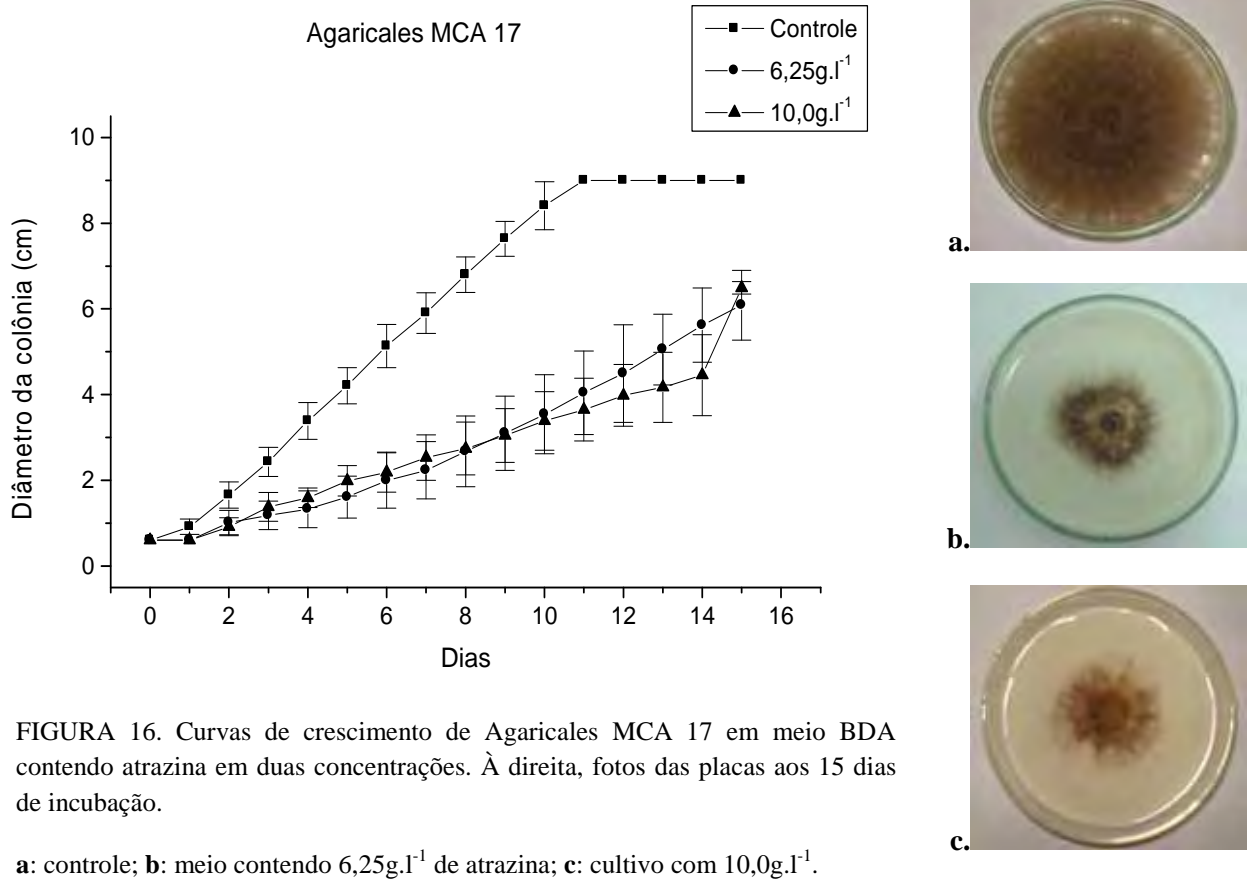
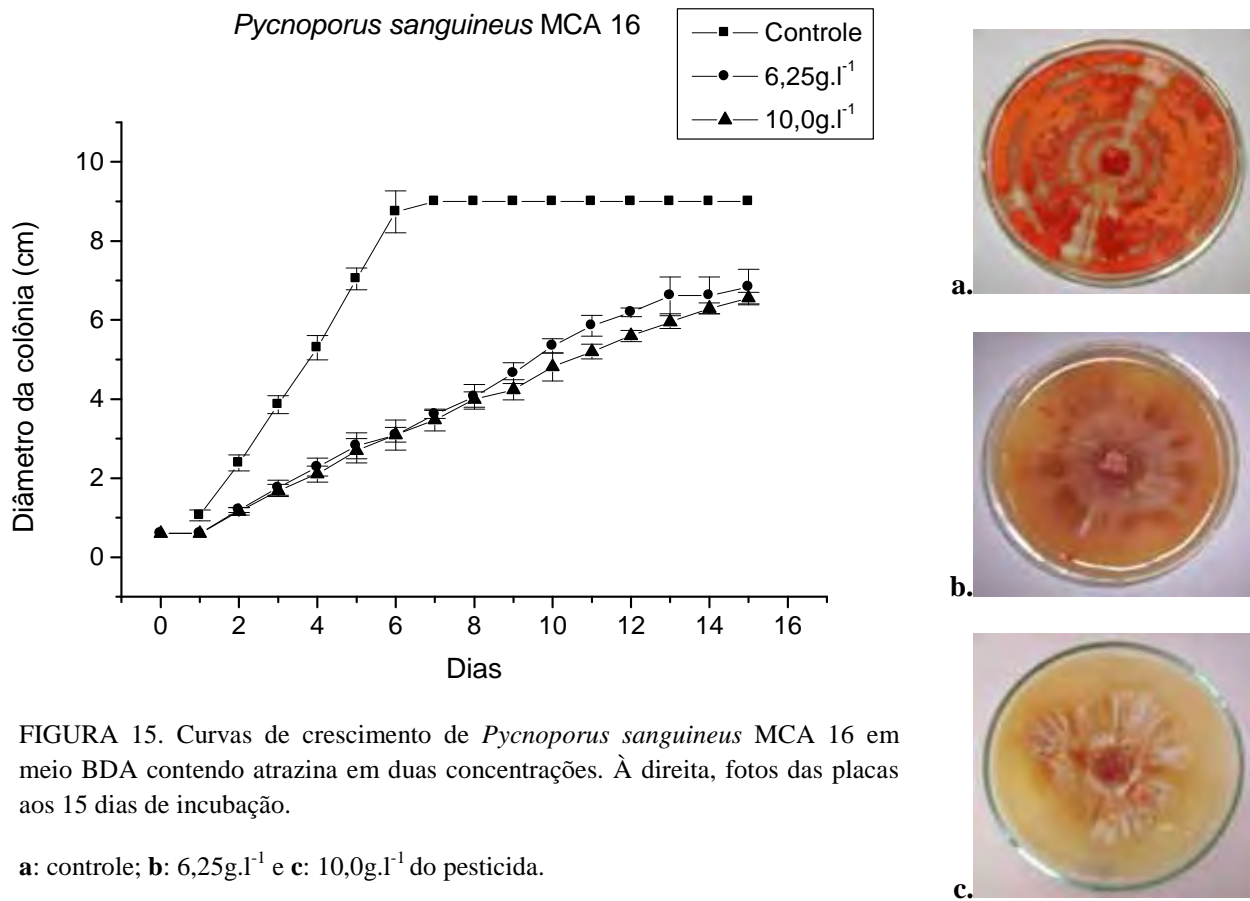
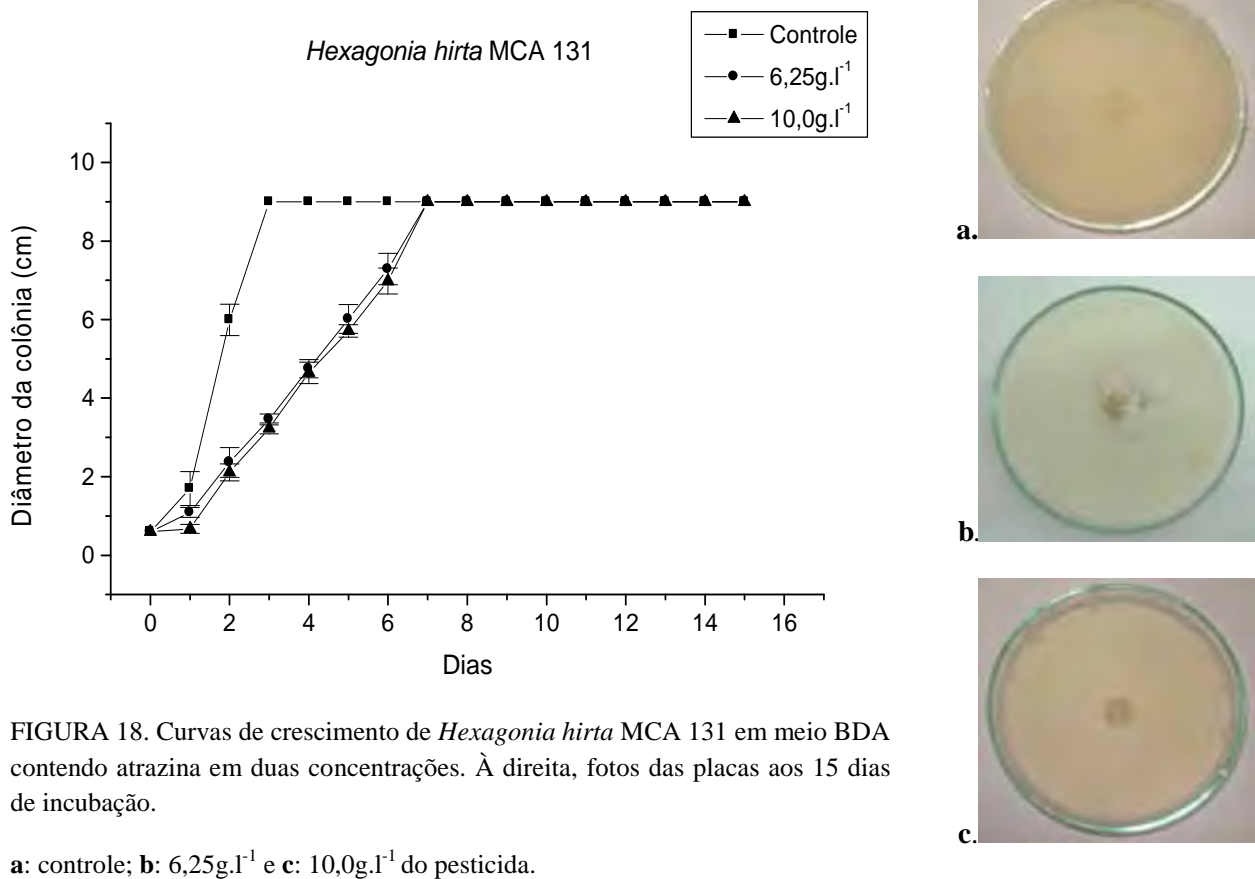
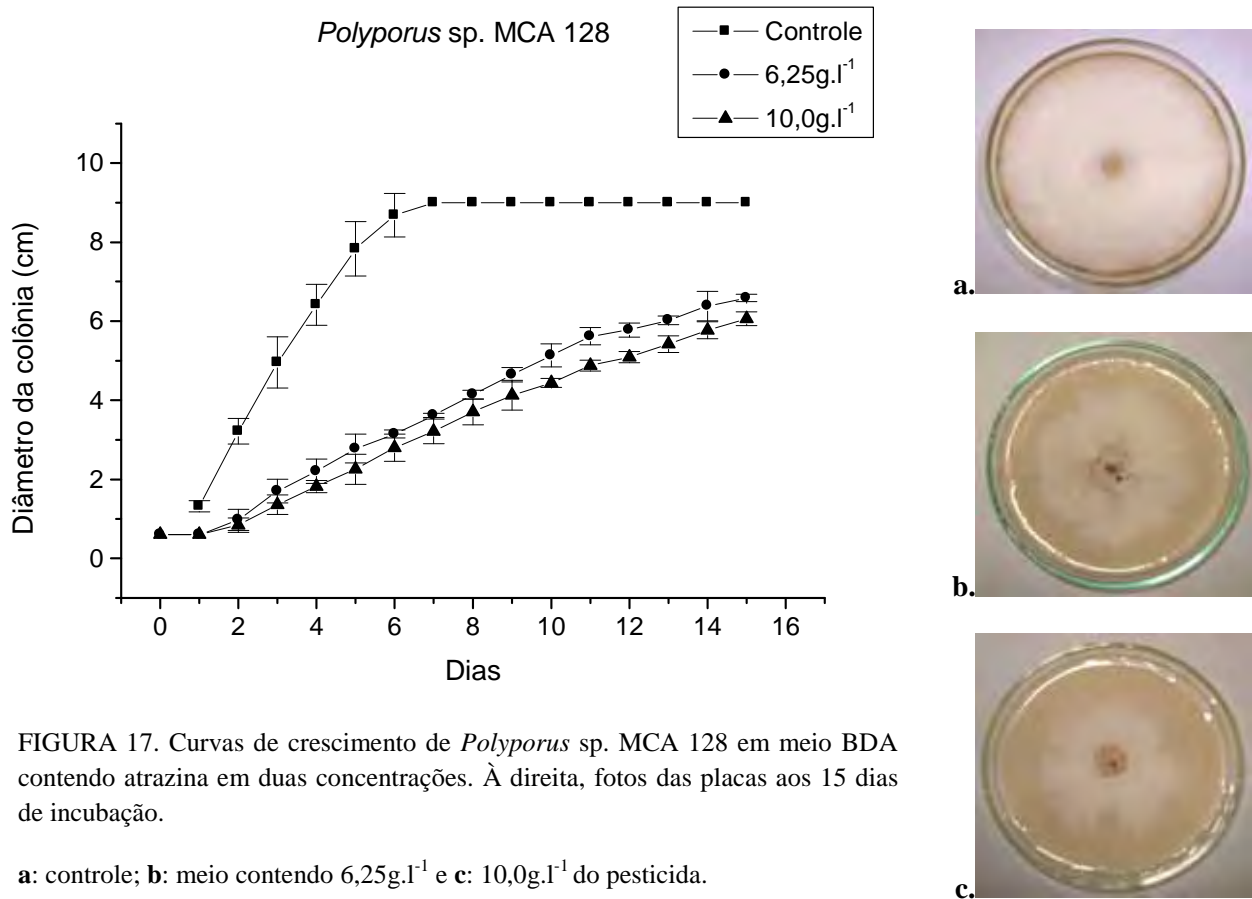


FIGURA 14. Curvas de crescimento de *Polyporus tenuiculus* MCA 11 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 6,25g.l⁻¹ de atrazina; c: 10,0g.l⁻¹ do pesticida.





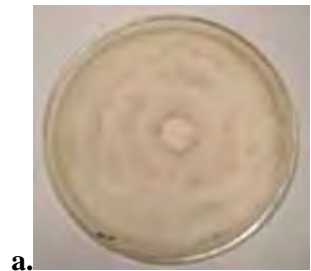
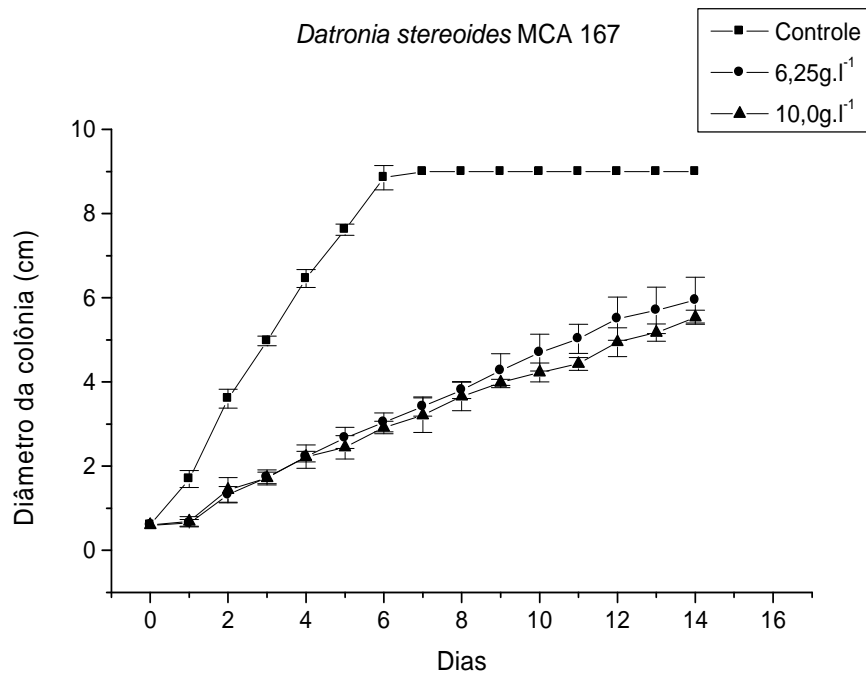


FIGURA 19. Curvas de crescimento de *Datronia stereoides* MCA 167 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 6,25g.l⁻¹; c: 10,0g.l⁻¹ de atrazina.

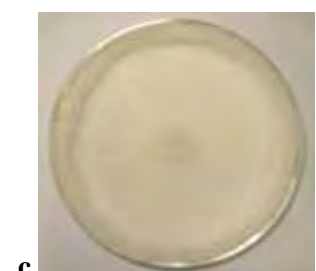
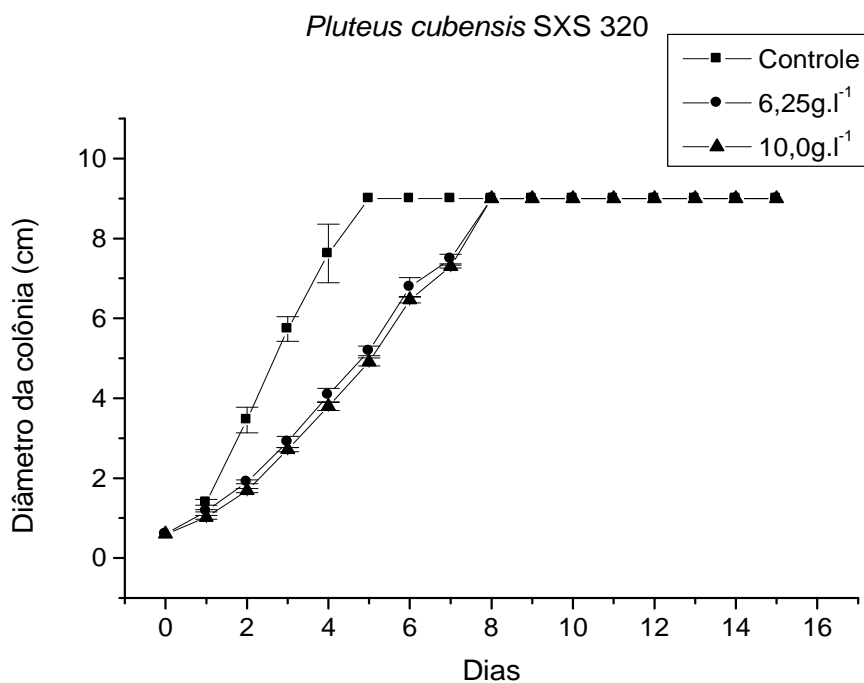


FIGURA 20. Curvas de crescimento de *Pluteus cubensis* SXS 320 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 6,25g.l⁻¹ de atrazina e c: cultivo com 10,0g.l⁻¹.

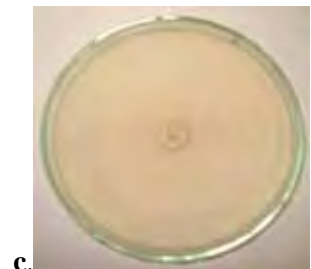
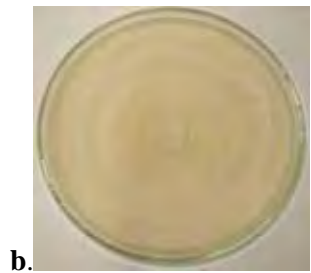
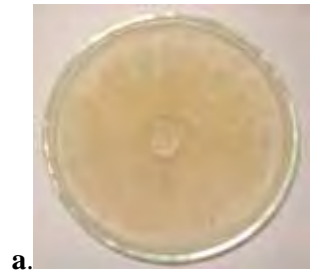
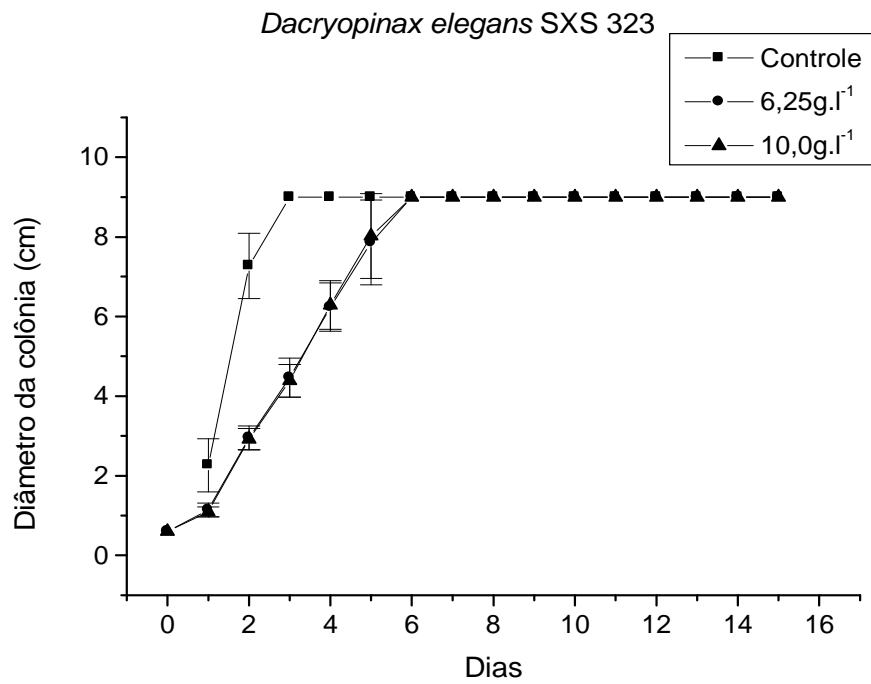


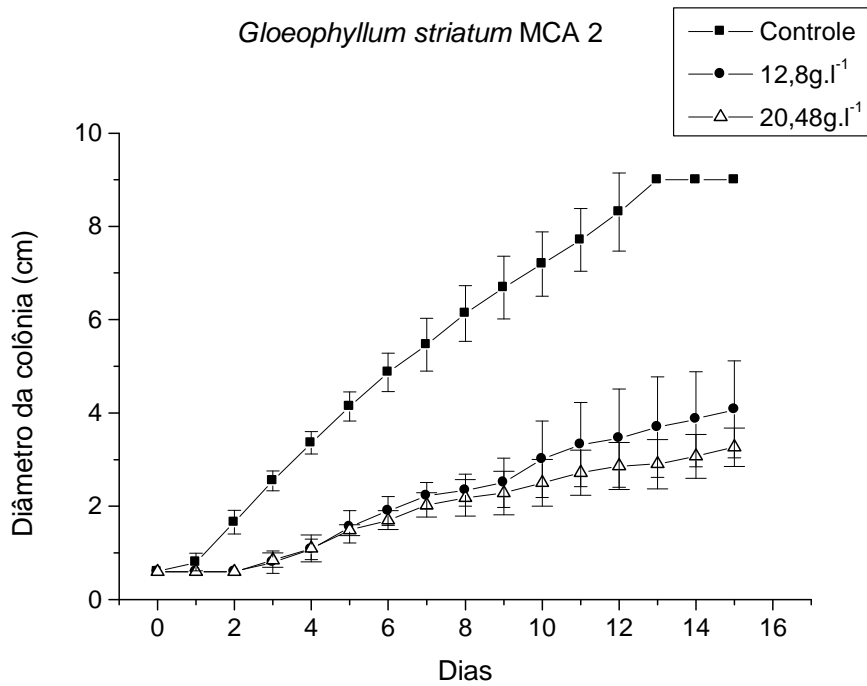
FIGURA 21. Curvas de crescimento de *Dacryopinax elegans* SXS 323 em meio BDA contendo atrazina em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio com 6,25g.l⁻¹ de atrazina e c: 10,0g.l⁻¹ do pesticida.

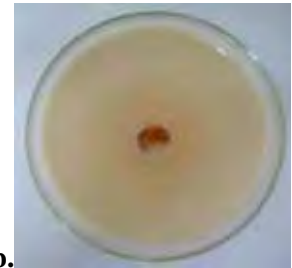
TABELA 2. Taxa de crescimento diário, adensamento micelial e inibição relativa nas duas concentrações de atrazina utilizadas.

Linhagem	Controle		Atrazina 6,25 g.l ⁻¹			Atrazina 10,00 g.l ⁻¹		
	Crescimento em diâmetro (cm/dia)	A.M.	Crescimento em diâmetro (cm/dia)	Inibição	A.M.	Crescimento em diâmetro (cm/dia)	Inibição	A.M.
MCA 2 <i>Gloeophyllum striatum</i>	0,694 ± 0,08	2	0,359 ± 0,03	48,3%	3	0,326 ± 0,01	53,0%	3
MCA 5 <i>Datronia caperata</i>	0,735 ± 0,09	2	0,239 ± 0,02	67,4%	1	0,241 ± 0,02	67,2%	1
MCA 6 <i>Trametes modesta</i>	1,076 ± 0,19	2	0,429 ± 0,05	60,1%	3	0,367 ± 0,01	65,9%	3
MCA 7 <i>Gloeophyllum striatum</i>	0,988 ± 0,04	2	0,386 ± 0,04	60,9%	3	0,378 ± 0,04	61,4%	3
MCA 9 <i>Polyporus tenuiculus</i>	0,418 ± 0,01	3	0,244 ± 0,02	41,7%	3	0,218 ± 0,00	47,7%	3
MCA 11 <i>Polyporus tenuiculus</i>	0,818 ± 0,05	3	0,413 ± 0,04	49,5%	3	0,326 ± 0,01	60,1%	3
MCA 16 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	1,408 ± 0,05	3	0,456 ± 0,05	67,6%	3	0,437 ± 0,02	68,9%	3
MCA 17 Agaricales n. i.	0,848 ± 0,05	3	0,405 ± 0,08	52,2%	2	0,433 ± 0,01	49,0%	2
MCA 128 <i>Polyporus</i> sp.	1,566 ± 0,14	3	0,439 ± 0,05	71,9%	3	0,404 ± 0,02	74,2%	3
MCA 131 <i>Hexagonia hirta</i>	2,998 ± 0,20	1	1,245 ± 0,02	58,5%	1	1,164 ± 0,04	61,2%	1
MCA 167 <i>Datronia stereoides</i>	1,524 ± 0,02	3	0,407 ± 0,03	73,3%	3	0,379 ± 0,01	75,1%	3
SXS 323 <i>Dacryopinax elegans</i>	3,635 ± 0,41	3	1,558 ± 0,15	57,1%	3	1,572 ± 0,21	56,7%	3
SXS 320 <i>Pluteus cubensis</i>	1,906 ± 0,18	3	1,069 ± 0,02	43,8%	3	0,729 ± 0,00	61,7	3

A.M.: adensamento micelial: 1- fracamente adensado; 2 – mediamente adensado; 3 – fortemente adensado.



a.



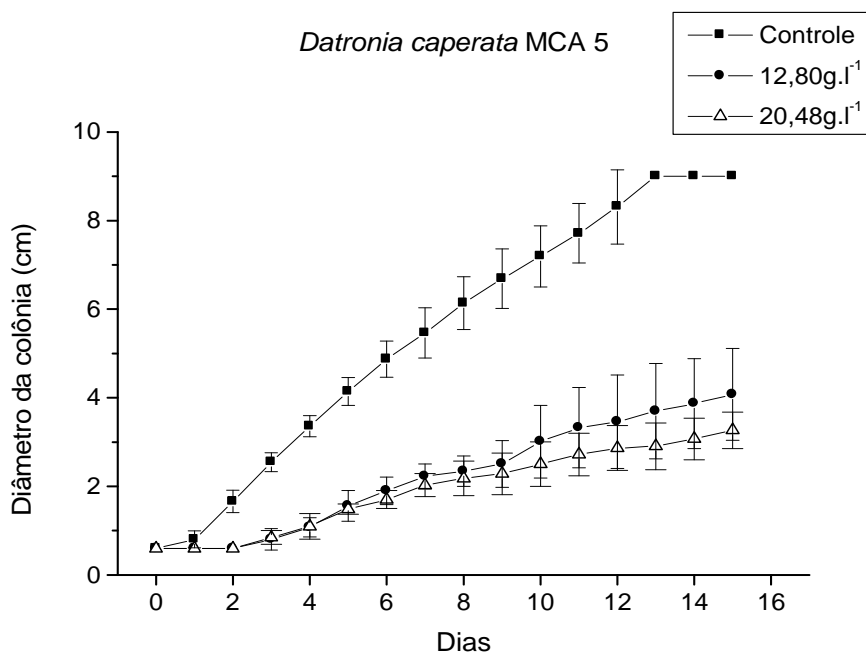
b.



c.

FIGURA 22. Curvas de crescimento de *Gloeophyllum striatum* MCA 2 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

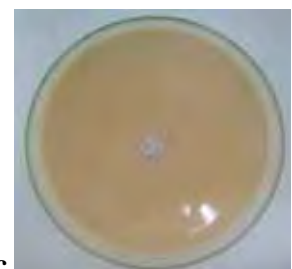
a: controle; b: meio contendo 12,8g.l⁻¹ do diurom e c: cultivo com 20,48g.l⁻¹.



a.



b.



c.

FIGURA 23. Curvas de crescimento de *Datronia caperata* MCA 5 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 12,8g.l⁻¹; c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.

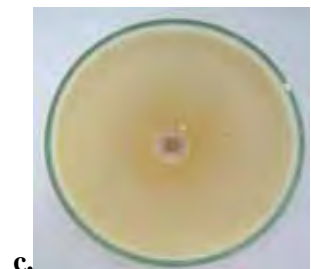
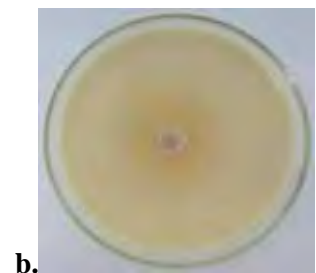
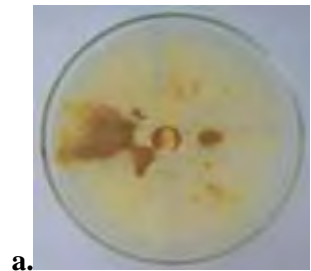
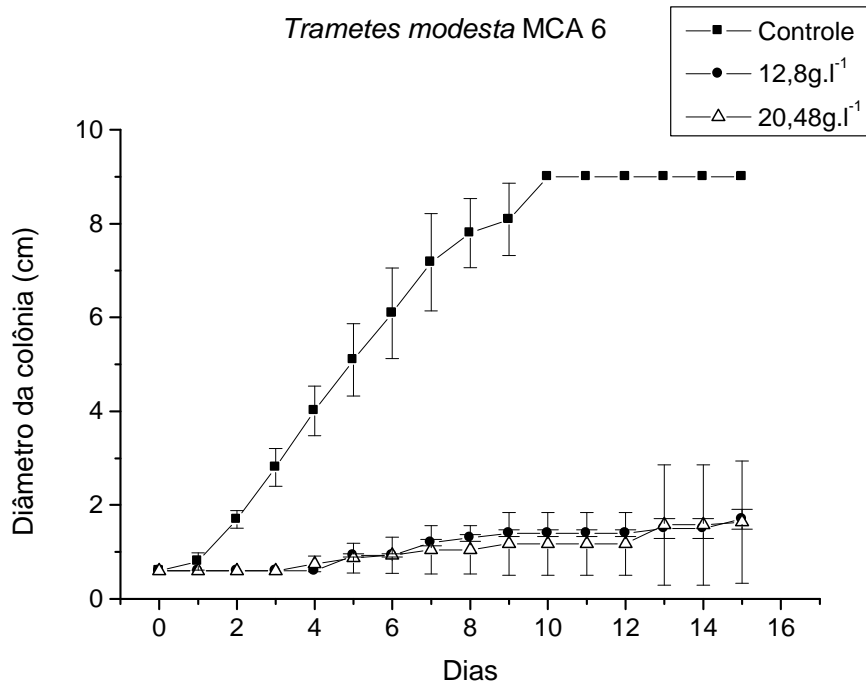


FIGURA 24. Curvas de crescimento de *Trametes modesta* MCA 6 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.

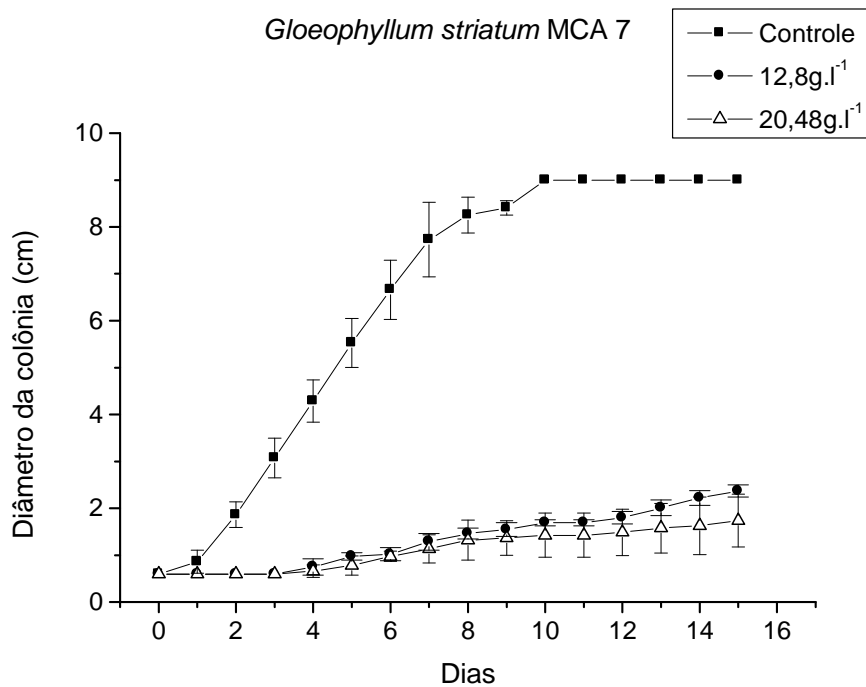


FIGURA 25. Perfil de crescimento *Gloeophyllum striatum* MCA 7 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.

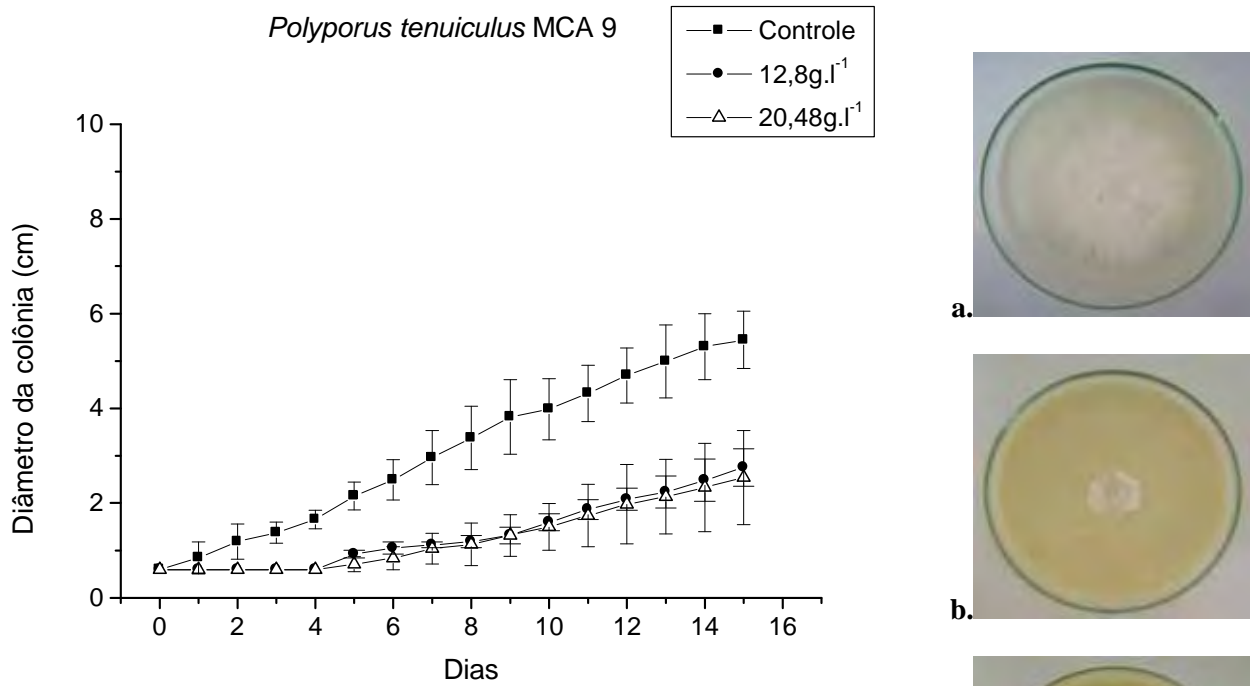


FIGURA 26. Perfil de crescimento *Polyporus tenuiculus* MCA 9 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 12,8g.l⁻¹ d diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.

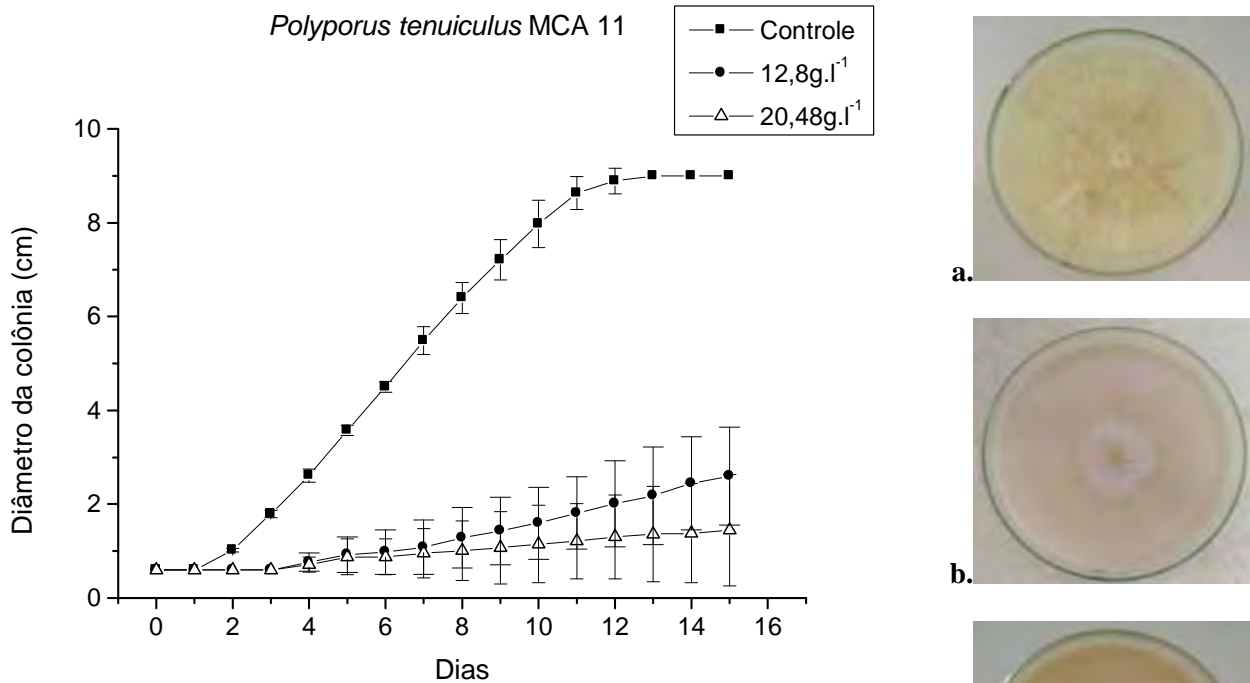
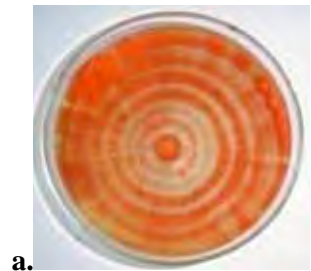
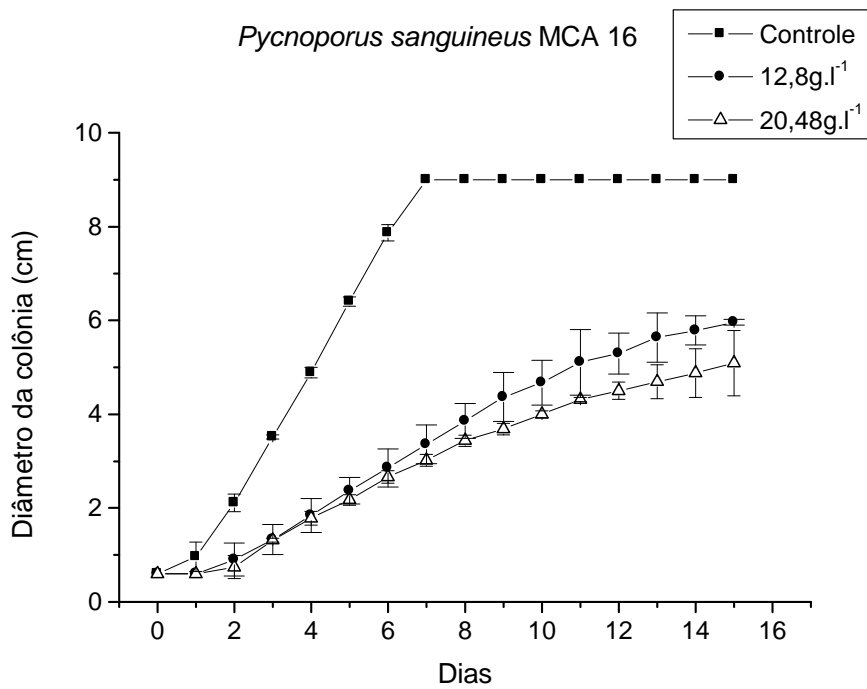


FIGURA 27. Curvas de crescimento para *Polyporus tenuiculus* MCA 11 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.



a.



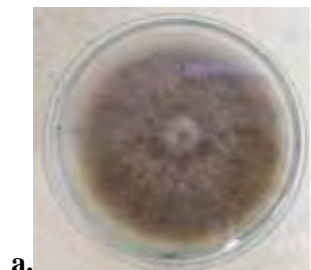
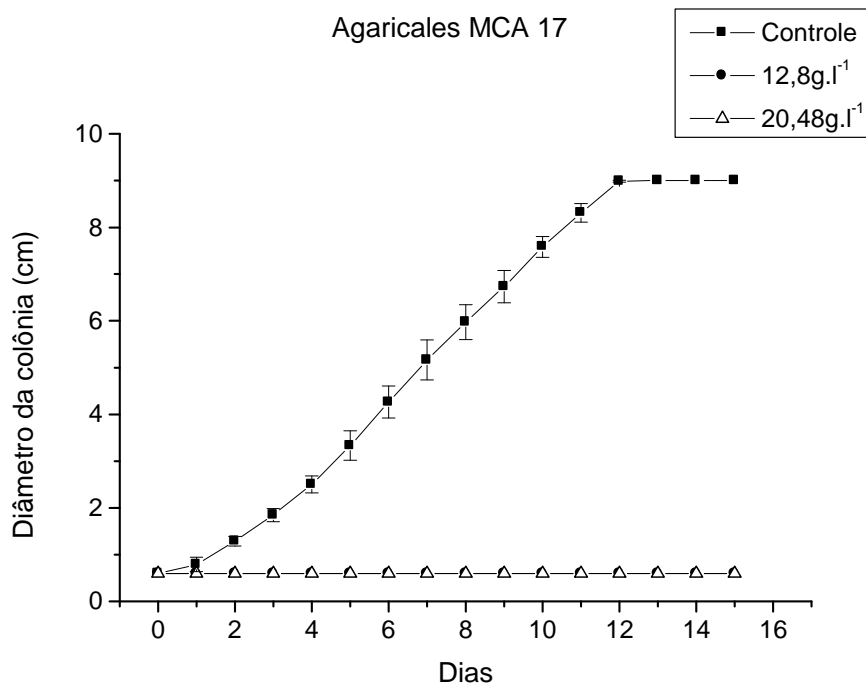
b.



c.

FIGURA 28. Curvas de crescimento de *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

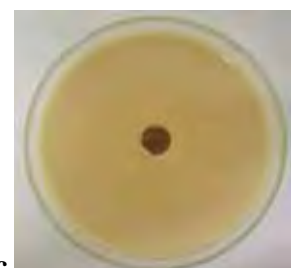
a: controle; b: meio contendo 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.



a.



b.



c.

FIGURA 29. Perfil de crescimento de Agaricales MCA 17 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 12,8g.l⁻¹ e c: 20,48g.l⁻¹ do diurom.

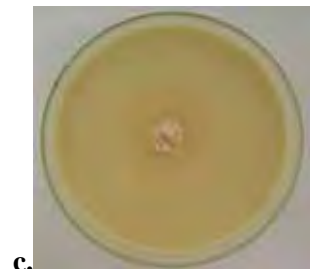
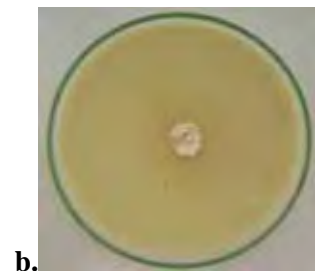
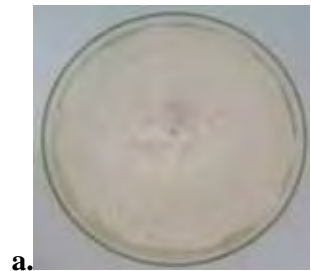
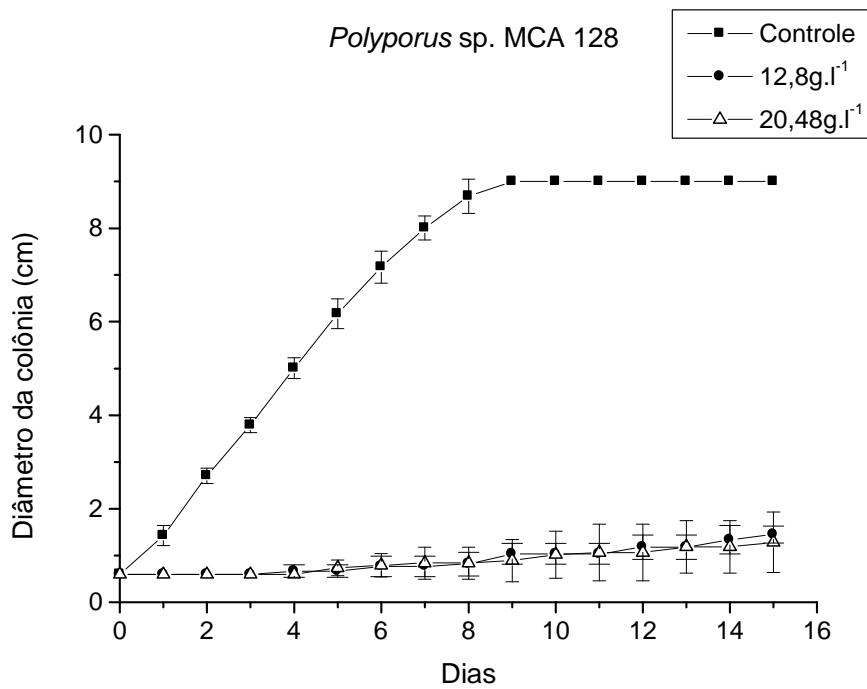


FIGURA 30. Curvas de crescimento de *Polyporus* sp. MCA 128 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.

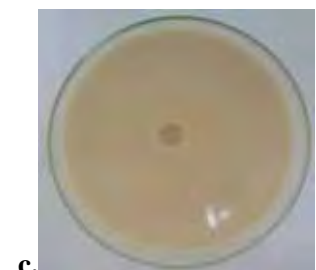
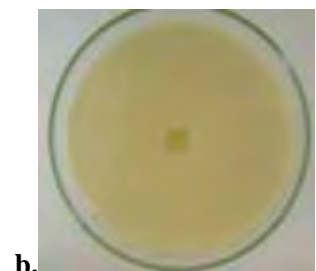
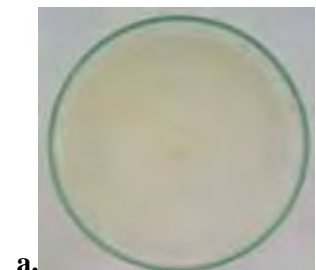
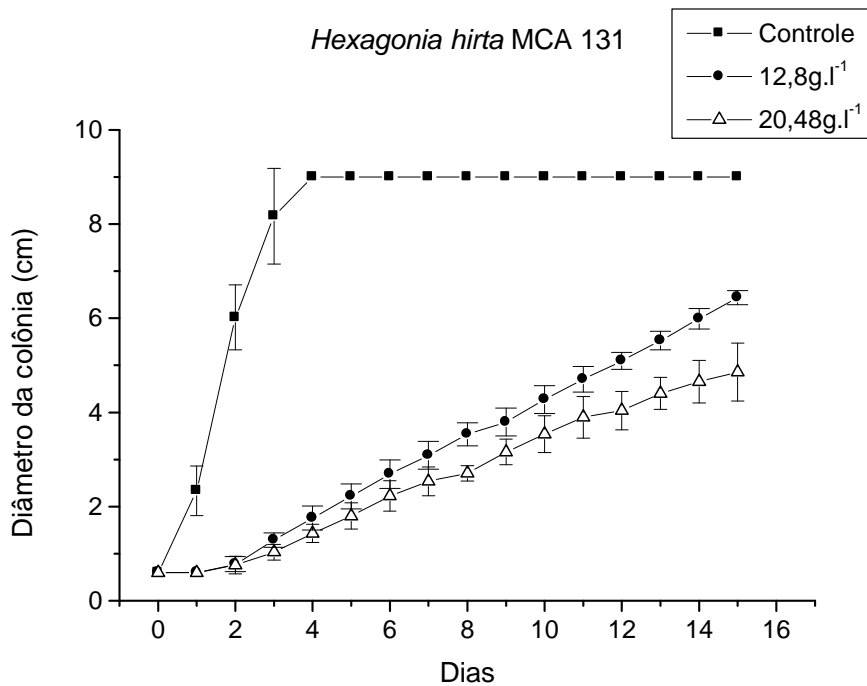


FIGURA 31. Curvas de crescimento de *Hexagonia hirta* MCA 131 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: cultivo com 20,48g.l⁻¹.

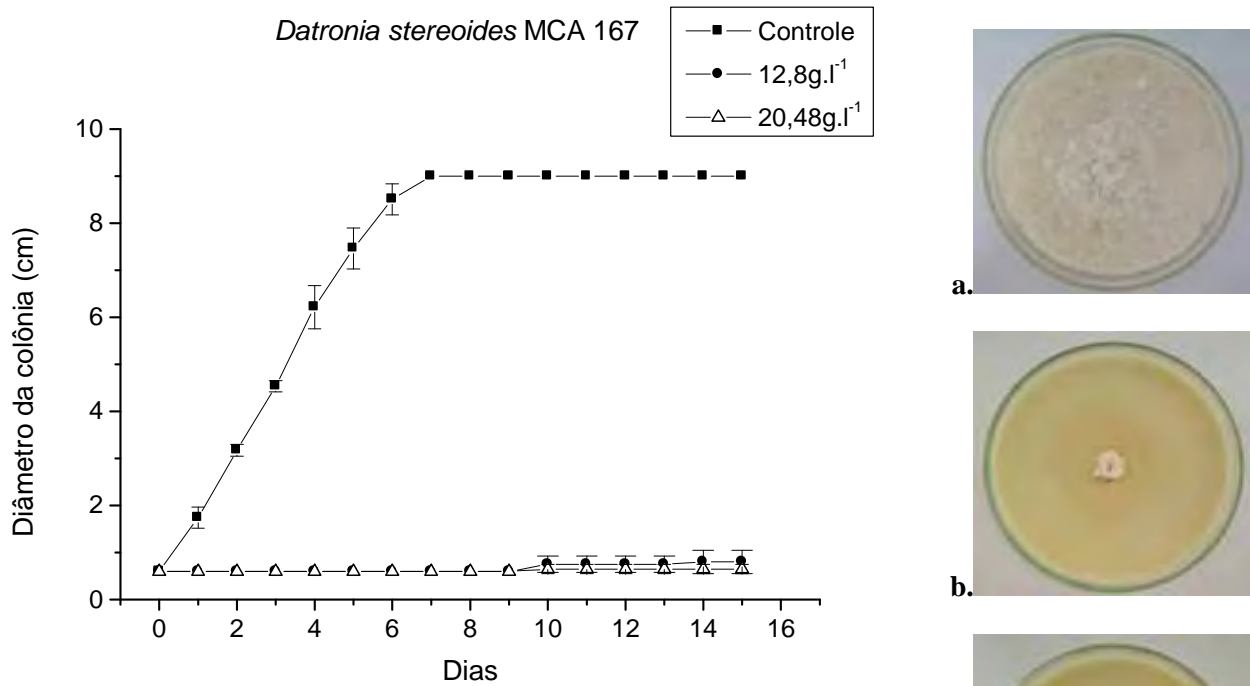


FIGURA 32. Curvas de crescimento de *Datronia stereoides* MCA 167 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: meio contendo 12,8g.l⁻¹ d diurom e c: cultivo com 20,48g.l⁻¹.

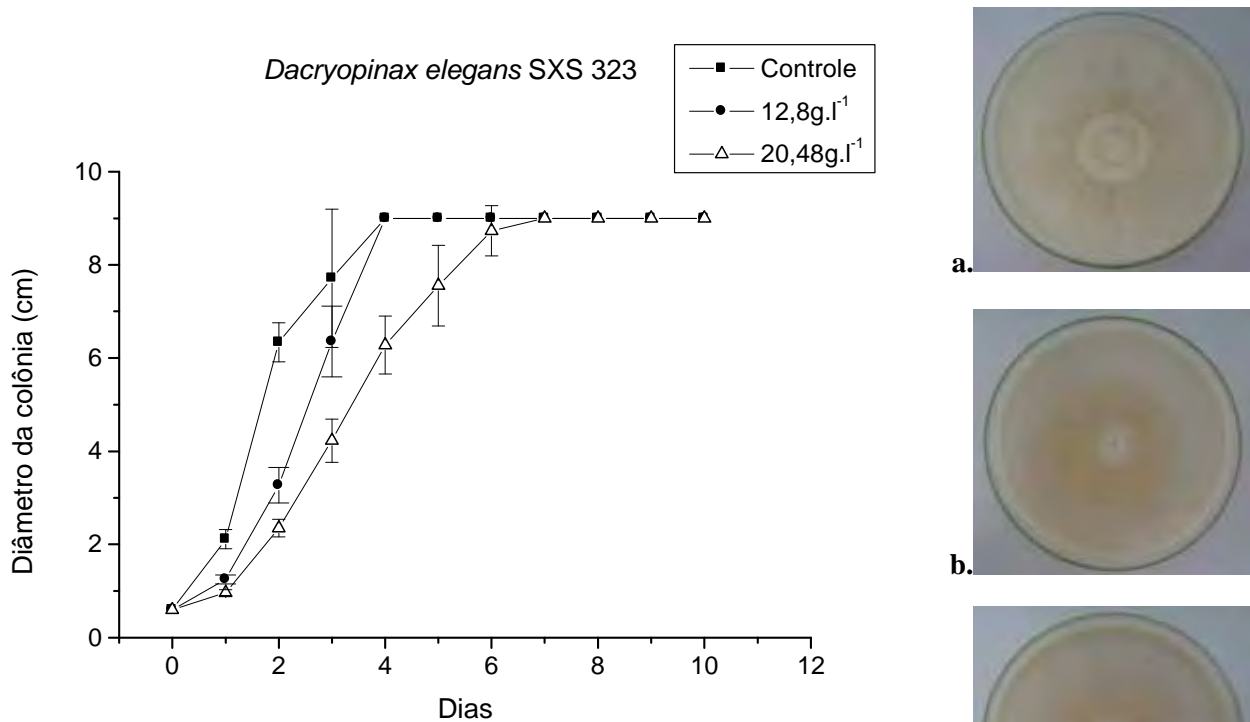


FIGURA 33. Perfil de crescimento de *Dacryopinax elegans* SXS 323 em meio BDA contendo diurom em duas concentrações. À direita, fotos das placas aos 15 dias de incubação.

a: controle; b: 12,8g.l⁻¹ de diurom e c: 20,48g.l⁻¹ do pesticida.

TABELA 3. Características de inibição e velocidade de crescimento e adensamento micelial das doze linhagens cultivadas em meio BDA contendo diurom.

Linhagem	Controle		Diurom 12,80 g.l ⁻¹			Diurom 20,48 g.l ⁻¹		
	Crescimento em diâmetro (cm/dia)	A.M.	Crescimento em diâmetro (cm/dia)	Inibição	A.M.	Crescimento em diâmetro (cm/dia)	Inibição	A.M.
MCA 2 <i>Gloeophyllum striatum</i>	0,692 ± 0,06	2	0,272 ± 0,07	60,7 %	2	0,218 ± 0,03	68,6%	2
MCA 5 <i>Datronia caperata</i>	0,691 ± 0,08	2	0,293 ± 0,05	57,6%	1	0,247 ± 0,05	64,2%	1
MCA 6 <i>Trametes modesta</i>	0,899 ± 0,09	2	0,113 ± 0,04	87,4%	2	0,109 ± 0,06	87,9%	2
MCA 7 <i>Gloeophyllum striatum</i>	0,934 ± 0,02	2	0,158 ± 0,01	83,1%	2	0,116 ± 0,04	87,6%	2
MCA 9 <i>Polyporus tenuiculus</i>	0,363 ± 0,04	3	0,183 ± 0,03	49,5%	3	0,169 ± 0,05	53,4%	3
MCA 11 <i>Polyporus tenuiculus</i>	0,740 ± 0,02	3	0,173 ± 0,07	76,6%	3	0,096 ± 0,04	87,0%	3
MCA 16 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	1,311 ± 0,03	3	0,397 ± 0,05	69,7%	3	0,339 ± 0,12	74,1%	3
MCA 17 Agaricales n. i.	0,749 ± 0,02	3	0,0	100,0 %	-	0,0	100,0 %	-
MCA 128 <i>Polyporus</i> sp.	1,086 ± 0,04	3	0,097 ± 0,01	91,1%	3	0,086 ± 0,04	92,1%	3
MCA 131 <i>Hexagonia hirta</i>	2,723 ± 0,34	1	0,429 ± 0,01	84,24%	1	0,324 ± 0,08	88,1%	1
MCA 167 <i>Datronia stereoides</i>	1,418 ± 0,09	3	0,053 ± 0,01	96,2%	3	0,043 ± 0,00	96,9%	3
SXS 323 <i>Dacryopinax elegans</i>	2,571 ± 0,21	3	2,117 ± 0,25	17,6%	3	1,455 ± 0,17	43,4%	3

A. M.: adensamento micelial, sendo considerados: 1 – micélio fracamente adensado; 2 – mediamente adensado; e 3 – fortemente adensado.

5. 2. FERMENTAÇÃO DE SUPERFÍCIE DOS FUNGOS EM MEIO CONTENDO DIUROM OU ATRAZINA

Após os testes de tolerância realizados em meio sólido, foram selecionadas as duas linhagens mais resistentes a cada um dos herbicidas para melhor avaliar seu potencial de degradação daqueles compostos. A capacidade de crescer na presença do composto supostamente tóxico é uma característica fundamental nestes casos, e muitas vezes está relacionada à capacidade de detoxificação do mesmo (BONONI, 1998). Assim como a síntese e secreção de enzimas ligninolíticas, este processo é desencadeado ou estimulado, muitas vezes, por condições de exaustão de nitrogênio do meio de cultivo (BUSWELL, MOLLET, ODIER, 1984; KAAL, FIELD, JOYCE, 1995; YASSIR, RIEU, SOULAS, 1998).

Para verificar a real capacidade de remoção de cada um dos herbicidas testados, as linhagens foram cultivadas em meio líquido de Kirk *et al.* (1978) conforme item 4.7, em condições estacionárias, por 20 dias. Nos meios, foram utilizados glicose a 1% como fonte de carbono e 0,01% de NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio, configurando uma situação de nitrogênio limítrofe. A atrazina ou o diurom foram adicionados na concentração de 25 mg.l^{-1} .

Os resultados revelaram respostas marcadamente diferentes para os herbicidas e entre as linhagens microbianas. Como pode ser observado na tabela 4, o crescimento e o consumo de carbono do meio de todas as linhagens, foram afetados pela presença dos herbicidas, em maior ou menor extensão. As linhagens MCA 7, MCA 17 e SXS 320 foram as únicas capazes de modificar mais de 30% de pelo menos um dos herbicidas no período avaliado e de uma maneira geral, a atrazina se mostrou mais facilmente degradável pelos microrganismos em relação ao diurom. A linhagem SXS 320 *Pluteus cubensis* alcançou 96% de remoção do diurom inicialmente presente no meio de cultivo (Tabela 4).

A fração adsorvida ao micélio foi analisada para as linhagens que apresentaram melhores resultados relativos à degradação. No caso do diurom, foram MCA 11, MCA 16, MCA 131 e SXS 320. Para a atrazina, foram investigados os micélios da maior parte das linhagens: MCA 2, MCA 5, MCA 6, MCA 7, MCA11, MCA 16, MCA 17, MCA 167 e SXS 320, que apresentaram eficiência inferior a 5% de degradação. Nos extratos dos micélios, não foi observada adsorção de mais que 4,5% do total dos herbicidas inicialmente presentes no meio, confirmando o desaparecimento efetivo dos xenobióticos e pouco seqüestro pela biomassa (dados não tabulados).

TABELA 4. Crescimento fúngico e remoção dos herbicidas atrazina e diurom após 20 dias de cultivo estático, a 28°C, em meio líquido sintético pelas linhagens de basidiomicetos estudadas.

Linhagem	Controle		Diurom 25 mg.l ⁻¹			Atrazina 25mg.l ⁻¹		
	Biomassa (g.l ⁻¹)	A.R. (μM)	Degradação	Biomassa (g.l ⁻¹)	A.R. (μM)	Degradação	Biomassa (g.l ⁻¹)	A.R. (μM)
MCA 2 <i>Gloeophyllum striatum</i>	0,928	51,42	0,00%	0,657	53,44	0,00%	0,517	55,50
MCA 5 <i>Datronia caperata</i>	0,794	55,31	6,92%	0,494	55,50	10,42%	0,640	54,93
MCA 6 <i>Trametes modesta</i>	1,706	36,59	0,00%	0,181	55,5	14,11%	0,931	43,98
MCA 7 <i>Gloeophyllum striatum</i>	1,300	47,76	0,00%	0,987	51,18	37,34%	1,377	49,58
MCA 9 <i>Polyporus tenuiculus</i>	0,976	50,64	1,86%	0,369	55,50	4,42%	0,623	49,43
MCA 11 <i>Polyporus tenuiculus</i>	1,716	43,30	11,32%	1,062	55,50	13,92%	0,851	49,98
MCA 16 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	1,468	50,66	7,50%	0,796	46,67	11,41%	1,008	46,46
MCA 17 Agaricales n. i.	0,781	40,98	0,00%	0,245	55,50	38,67%	0,715	43,87
MCA 128 <i>Polyporus</i> sp.	5,074	6,48	0,00%	24,700	6,85	0,00%	4,622	6,28
MCA 131 <i>Hexagonia hirta</i>	2,108	35,04	14,55%	1,082	53,65	8,63%	1,352	48,04
MCA 167 <i>Datronia stereoides</i>	5,522	6,28	0,00%	39,429	7,65	2,87%	5,039	6,26
SXS 320 <i>Pluteus cubensis</i>	1,406	29,55	96,69%	1,515	32,51	30,03%	0,943	32,32
SXS 323 <i>Dacryopinax elegans</i>	2,394	14,5	0,00%	1,639	15,81	3,78%	1,433	21,93

A. R.: açúcares redutores

Algumas linhagens, como MCA 128 *Polyporus* sp. e MCA 167 *Datronia stereoides* tiveram o crescimento mercadamente estimulado em presença do diurom, a exemplo do verificado para *Mycelia sterilia* INBI 2-26 em presença de atrazina (VASIL'CHENKO *et al.*, 2002); tal comportamento provavelmente é parte da resposta fisiológica ao stress ocasionado em função da contato com compostos tóxicos. É interessante observar que para estas espécies o aumento no crescimento não teve qualquer relação positiva com o potencial de biodegradação, que foi mínimo para ambos os herbicidas, neste caso.

Em relação à produção de enzimas ligninolíticas, pode-se observa na tabela 5 que apenas lacases foram detectadas nos extratos das culturas, e a enzima foi induzida na presença dos pesticidas. No caso da linhagem MCA 16 *Pycnoporus sanguineus*, uma das mais resistentes ao diurom, a indução foi de 2.416% da atividade enzimática constitutiva. A literatura reporta ocorrências de atuação de xenobióticos como indutores de ligninases (GORBATOVA *et al.*, 2006). No entanto, comparando as tabelas 4 e 5, não é possível evidenciar relação entre a produção de ligninases e a degradação dos herbicidas, a exemplo o que já foi verificado para outros basidiomicetos, como *Pleurotus ostreatus* e *Bjerkandera adusta* (NOVOTNÝ *et al.*, 2004; SCHÜTZENDÜBEL *et al.*, 1999).

5. 3. FERMENTAÇÃO DE SUPERFÍCIE DOS FUNGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO DIUROM

A presença de xenobióticos no meio de crescimento altera o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, interfere com a expressão de muitas enzimas. Para avaliar o efeito do diurom sobre a expressão das ligninases de *P. sanguineus* e *D. elegans*, selecionados como os microrganismos mais tolerantes ao diurom, estes foram cultivados por 20 dias em concentrações variando de 0 a 50 mg.l⁻¹ do pesticida. Bagaço de cana ou glicose a 1% foram utilizados como fontes de carbono adicionais, e quando a única fonte de carbono disponível era a molécula do herbicida, foram acrescentados cultivos contendo 1 g.l⁻¹ de diurom, suficiente para sustentar o crescimento, caso o fungo pudesse utilizá-lo como única fonte de carbono.

Nenhum dos fungos foi capaz de crescer quando o diurom foi a única fonte de carbono fornecida aos microrganismos. Nos meios contendo glicose ou bagaço de cana, foram produzidas lacases e manganês peroxidases por *P. sanguineus*, mas em nenhum dos experimentos atividade de lignina peroxidase foi detectada, o que não exclui sua possível presença em outros momentos no decorrer do cultivo, ou em níveis abaixo dos limiares de detecção do método empregado.

A produção de manganês peroxidase não apresentou variação considerável entre as fontes de carbono e tampouco sofreu interferência da concentração de pesticida no meio, mantendo-se entre 14 e 20 U.l⁻¹ nos cultivos suplementados com bagaço e 14 e 19 U.l⁻¹ nos meios contendo glicose (figura 34 a) sugerindo uma produção constitutiva.

A lacase de *Pycnoporus sanguineus* foi produzida em meio com glicose, indicando também um perfil de enzima constitutiva (figura 34 b). A maior produção da enzima em meio com glicose, em relação ao meio com bagaço de cana, pode ser atribuída à maior biomassa desenvolvida naquela condição. Embora não tenha sido possível avaliar a biomassa nos cultivos com bagaço de cana, devido à aderência do micélio às fibras, ele foi visualmente inferior.

A presença do diurom na concentração de 5 mg.l⁻¹ com glicose como fonte de carbono causou inibição da produção de enzimas; entretanto, em concentrações de 10 e 25 mg.l⁻¹ do pesticida, houve uma indução na produção de lacases. Os dados da figura 34 c mostram que concentrações do diurom acima de 25 mg.l⁻¹ inibiram o crescimento do fungo, refletindo em uma menor produção de biomassa e menor consumo de açúcar do meio.

A comparação entre os dados das figuras 34 a, b, c e d mostra que, embora o crescimento microbiano tenha sido menor em maiores concentrações do diurom, a produção da lacase foi induzida (maior atividade específica expressa em U/mg de massa seca). Os dados de biomassa e produção enzimática mostram que provavelmente os cultivos contendo 25 mg.l⁻¹ representam a máxima concentração do xenobiótico que suscita uma resposta proporcional pelo microrganismo.

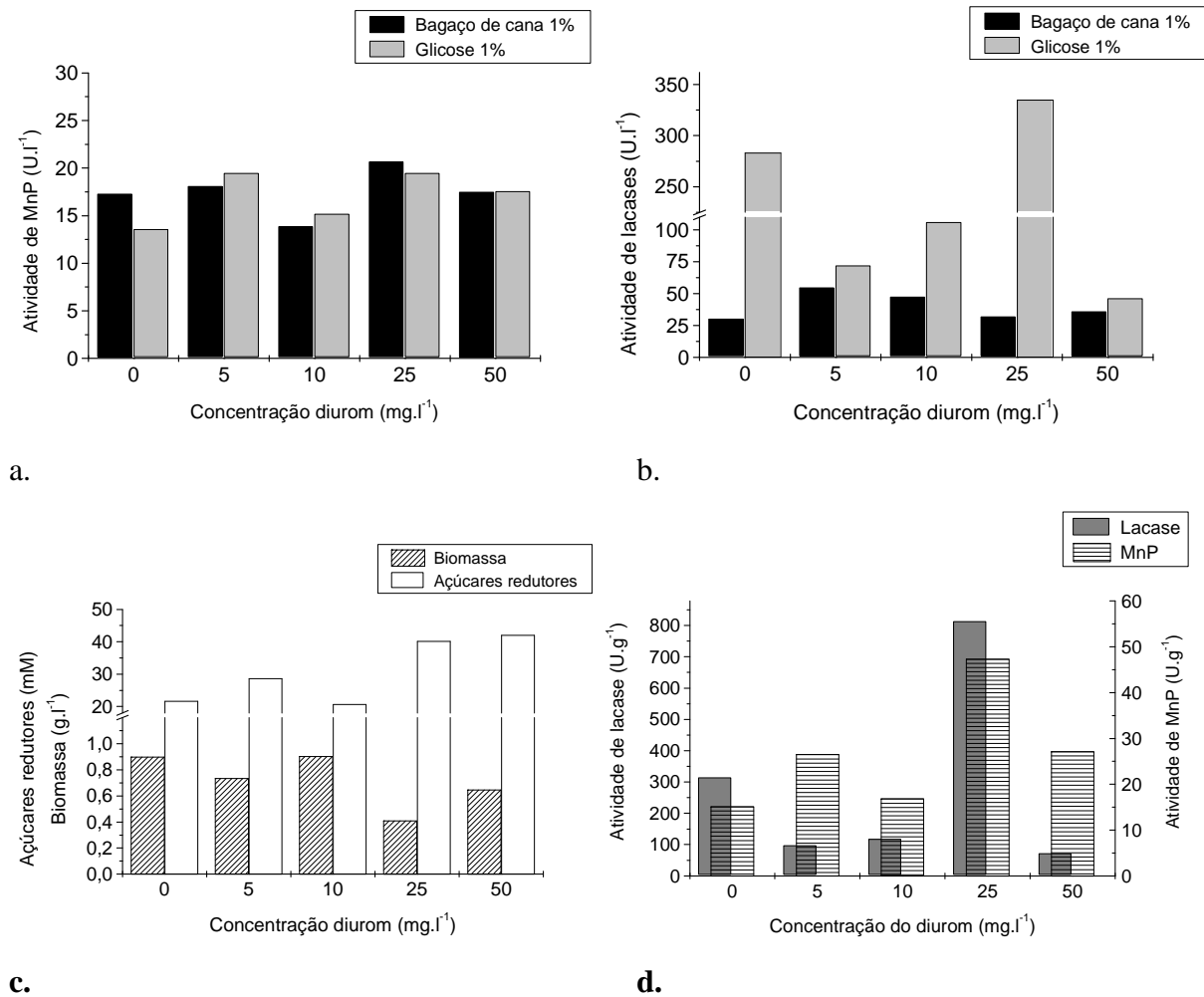


FIGURA 34. Efeito da concentração de diurom no crescimento e produção de enzimas por *P. sanguineus*, com cultivado em glicose ou bagaço de cana, por 20 dias. a: produção de manganês peroxidases; b: atividade de lacase nas diferentes condições do diurom, nos dois substratos; c: biomassa e açúcares redutores residuais no meio suplementado com glicose. d: Efeito indutor do diurom (atividade específica), na produção de lacases e MnP em meio com glicose, com máximo no meio contendo 25mg.l⁻¹ do herbicida.

A indução das enzimas do sistema ligninolítico em presença de xenobióticos é freqüentemente reportada na literatura. Rezende e colaboradores (2005) evidenciaram pronunciada indução na produção de lacases por *Pleurotus ostreatus* em cultivos contendo o herbicida imazaquin em concentrações acima de 1,5%, sem que o crescimento fúngico tenha

sido inibido. Os aditivos tóxicos atrazina, xilidina, nonilfenol e anilina também estimularam a produção de lacases por *Trametes versicolor* (MOUGIN, KOLLMANN, JOLIVALT, 2002).

O microrganismo *Dacryopinax elegans* SXS 323, apesar de crescer nas condições testadas acima, exceto quando o diurom foi a única fonte de carbono fornecida, não produziu nenhuma das enzimas ligninolíticas. Nos testes realizados com diferentes concentrações de diurom e 20 dias de cultivo, o fungo se desenvolveu bem nos meios suplementados com glicose ou bagaço de cana a 1%, mas também não produziu ligninases, em qualquer das circunstâncias avaliadas.

A adição de indutores como o álcool veratrílico e outros compostos fenólicos, e a supressão dos níveis de nitrogênio do meio foram testados na tentativa de induzir a síntese das enzimas, visto que o microrganismo já demonstrou esta capacidade em experimentos de fermentação em estado sólido (SANTOS, 2003). Porém, nenhuma das tentativas de induzir a expressão das ligninases em cultura líquida surtiu efeito, embora o microrganismo tenha se desenvolvido muito bem e demonstrado rápido crescimento; dos 50 mM de glicose inicialmente adicionados aos meios, quando realizadas curvas de crescimento, após 8 dias restavam apenas 1,7 e 13,8 mM nas culturas sem diurom e contendo 25 mg.l⁻¹ do composto, respectivamente (figura 35 a). O perfil de crescimento microbiano foi também muito similar nas duas condições (figura 35 b).

No que tange à degradação do diurom, mesmo após 40 dias de cultivo, não houve alteração dos níveis iniciais, demonstrando que a tolerância do microrganismo ao herbicida não está associada à sua degradação. Esses dados indicam que o fungo foi indiferente à presença do diurom no meio de cultivo, não sofrendo inibição do crescimento e no consumo de glicose do meio.

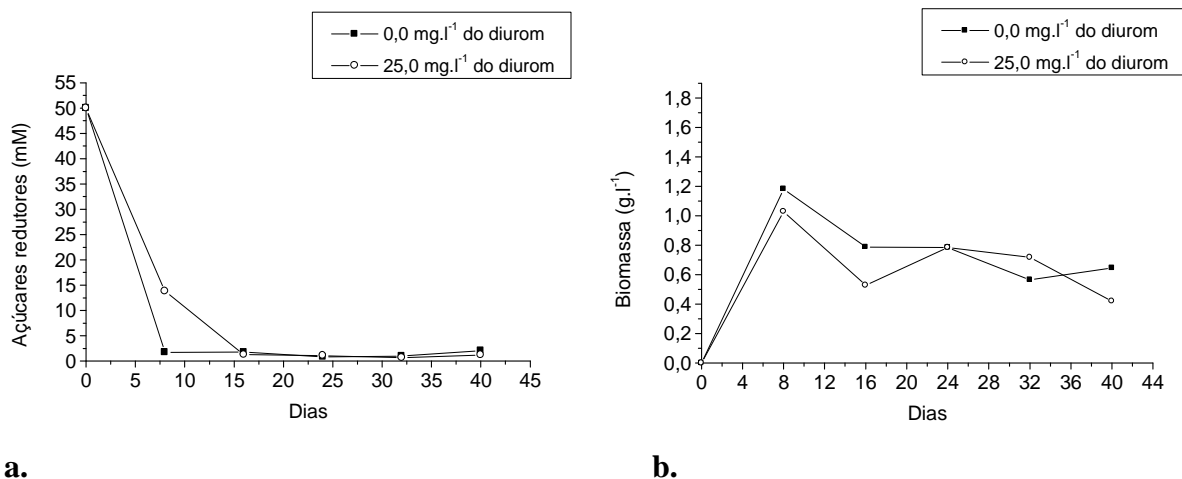


FIGURA 35. Desenvolvimento de *D. elegans* SXS 323 em culturas suplementadas com glicose. Não foi observada produção de ligninases ou degradação do diurom. a: consumo dos açúcares redutores em presença de 25 mg.l⁻¹ ou ausência do diurom; b: biomassa produzida ao longo do cultivo (peso seco), em presença de 25 mg.l⁻¹ ou ausência do diurom.

5. 4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR *Pycnoporus sanguineus* AO LONGO DO PROCESSO FERMENTATIVO

A produção de enzimas ligninolíticas e a interferência temporal da presença do diurom no meio foram avaliadas em meio suplementado com 1% de glicose, em ausência do herbicida ou na presença de 25 mg.l⁻¹ do composto. A atividade enzimática, biomassa e açúcares redutores residuais foram avaliados a cada 4 dias. Não foi detectada atividade de lignina peroxidases em nenhuma das amostras. As atividades de lacase e manganês peroxidases são mostradas na figura 36.

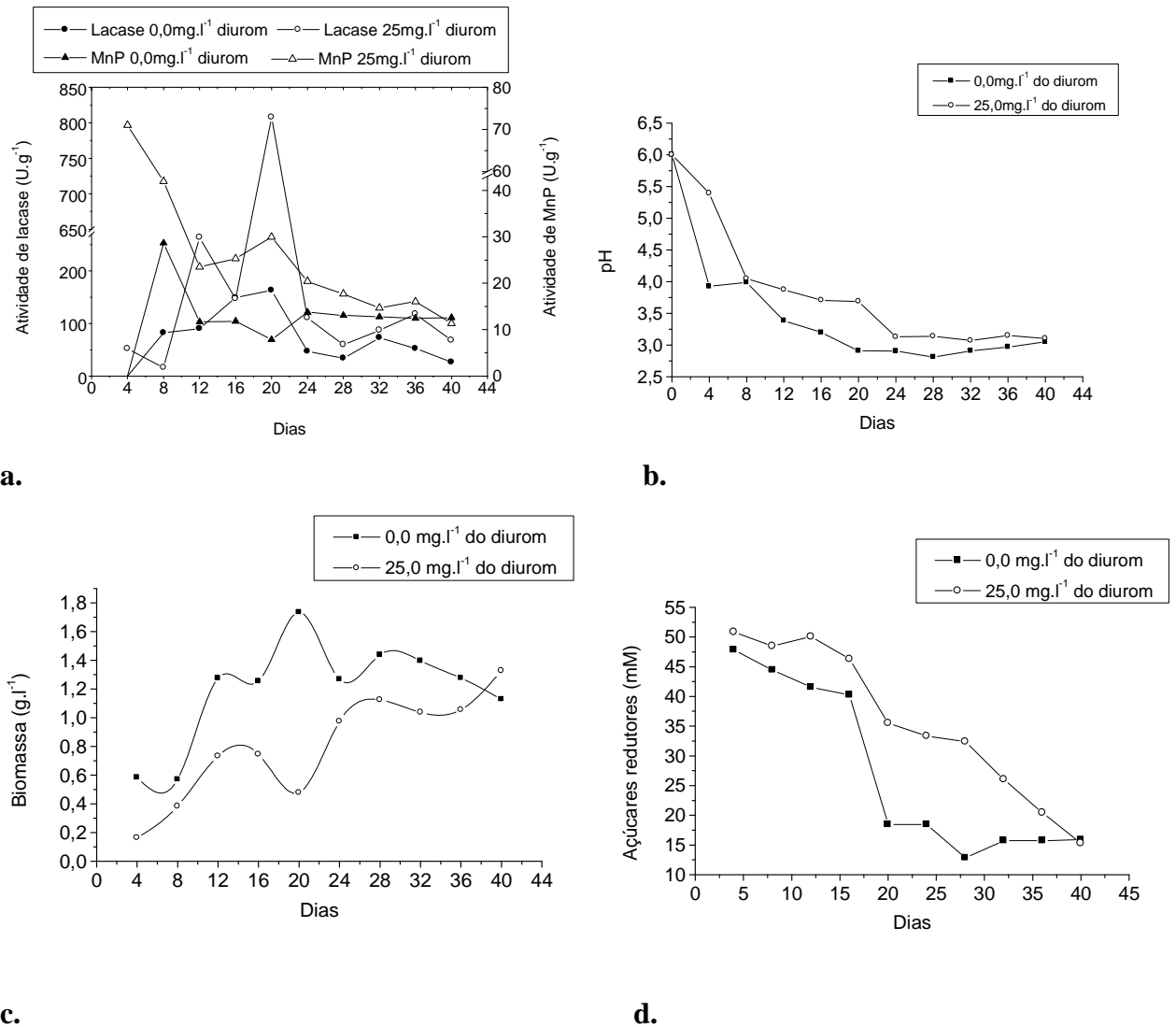


FIGURA 36. Produção de enzimas ligninolíticas e crescimento de *P. sanguineus* em meio contendo glicose e diuron (25 mg.l⁻¹). a: Atividade de lacase e manganês peroxidases. b: pH dos meios de cultura ao longo do cultivo; c: produção de biomassa e d: teores de açúcares redutores residuais no meio de cultura.

Em presença ou ausência do diuron, a atividade de manganês peroxidases se manteve praticamente inalterada por todo o período, oscilando entre 12 e 20 U.l⁻¹. O pico de lacase, por sua vez, ocorreu aos 20 dias de crescimento nas duas condições, alcançando 163 U por grama de biomassa fúngica no controle e 808 U.g⁻¹ (4,5 vezes superior) nos cultivos contendo diuron, apesar de o crescimento microbiano ter sido reduzido no meio contendo o herbicida.

Foi observada também uma acidificação mais lenta nos cultivos contendo diurom (figura 36 b, c, d). Estes dados confirmam o caráter de indução do diurom sobre a produção de lacases.

Foi observado por Hiratsuka, Warishii, Tanaka (2001), que mesmo com uma redução na ordem de três vezes da biomassa formada, a degradação dos herbicidas nitrofen e clornitrofen foi maior em meio com insuficiência de nitrogênio, provavelmente devido à forte indução das enzimas ligninolíticas por *Coriolus versicolor* nesta condição. Maiores taxas de degradação de atrazina também foram observadas quando os fungos *Coriolus hirsutus*, *Corioloopsis fulvocinerea* e *Cerrena maxima* foram cultivados em meio líquido contendo xenobióticos indutores do sistema ligninolítico, especialmente de lacases (GORBATOVA *et al.*, 2006).

5. 5. CARACTERIZAÇÃO DA LACASE PRODUZIDA POR *Pycnoporus sanguineus*

O potencial de aplicação das enzimas ligninolíticas nos processos de biorremediação, *in situ* ou em biorreatores, está diretamente ligada fatores do ambiente de reação que e como eles interferem com suas propriedades catalíticas (GIANFREDA, RAO, 2004). Por isso, as propriedades bioquímicas das lacases produzidas por *P. sanguineus* foram estudadas.

O pH é um dos fatores importantes em qualquer reação enzimática; dele dependem as conformações da enzima e do substrato, e as condições ótimas de pH para a ocorrência da interação proteína-substrato e catálise devem ser observadas (NELSON, COX, 2006). No caso das lacases, a faixa ótima de atuação geralmente situa-se em pHs ácidos, em função dos

padrões estruturais da enzima: a atividade das lacases decresce à medida em que aumenta a proporção de ânions OH^- no meio, porque as hidroxilas se ligam aos cobres dos domínios T2/T3 do sítio ativo, bloqueando a transferência de elétrons (BALDRIAN, 2006). A atividade preferencial das lacases em pH geralmente menor que 4 fica evidente quando se utiliza ABTS como substrato, já que o potencial redox deste último é independente do pH (LITTHAUER *et al.*, 2007). Quando os substratos são fenóis (2,6-dimetoxifenol, guaiacol), por outro lado, o pH ótimo de reação situa-se entre 4 e 7, porque o potencial redox de um fenol diminui com a liberação de prótons em pHs mais elevados.

A atividade das lacases de *P. sanguineus* em relação ao pH seguiu o padrão de outras lacases fúngicas, como a de *Telephora terrestris*, cujo pH ótimo de atividade é 3,4 (KANUNFRE, ZANCAN, 1998) e *Pycnoporus sanguineus* SCC 108, com atividade máxima em pH 3,0 (LITTHAUER *et al.*, 2007). Empregando como substrato o ABTS, a lacase de *P. sanguineus* MCA 16 exibiu pH ótimo de 2,5, e reteve cerca de 50% do potencial catalítico em pH 4,5. Em pH 5,5, foi observado apenas 10% da atividade relativa (figura 37 a).

O perfil de estabilidade da lacase de *P. sanguineus* em diferentes pHs e ausência do substrato foi oposto ao observado para o de atividade; a enzima foi mais estável em pH neutro, contrariando os dados obtidos de outras lacases, cuja estabilidade é maior em meio ácido (BALDRIAN, 2006). Uma possível explicação é que após 24 horas de incubação em pH ácido, os efeitos sobre a estrutura protéica e eventual desnaturação tenham suplantado aqueles causados ao sítio ativo por hidroxil-ânions em meio neutro.

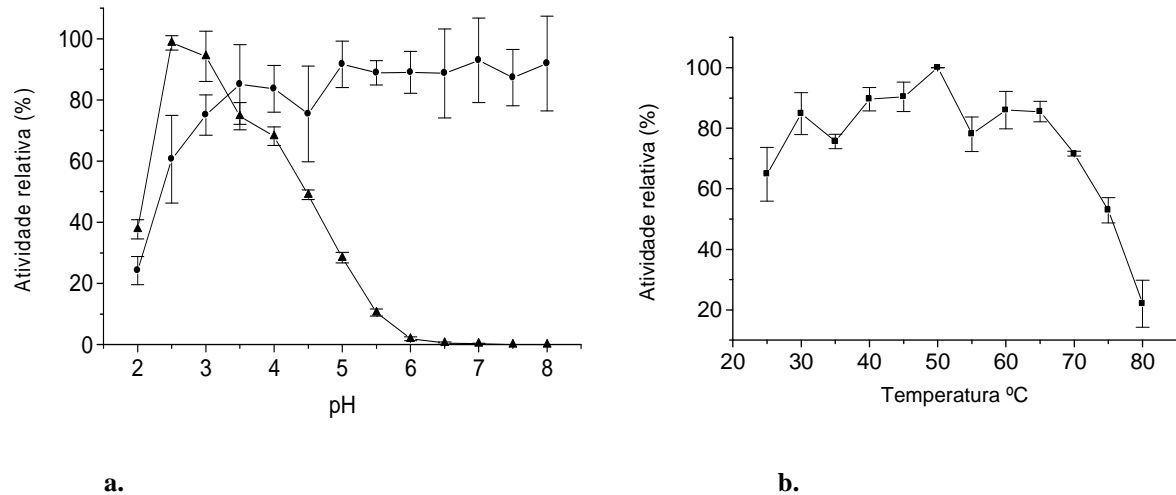


FIGURA 37. Propriedades da lacase de *P. sanguineus* MCA 16. a: efeito do pH sobre a atividade da enzima (▲); efeito do pH sobre a estabilidade da enzima em ausência de substrato (●). b: Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima (■).

A lacase de *P. sanguineus* demonstrou potencial de atuação em uma faixa de temperatura de 30 a 70°C, com pico em 50°C, característico de microrganismos mesofílicos (Figura 37 b), similar às enzimas de *Psilocybe castanella* CCB444 (NETO, 2006) e *Pycnoporus sanguineus* SCC 108 (LITTHAUER *et al.*, 2007) cuja atividade ótima está em torno dos 55°C, e *Trametes modesta*, cuja temperatura mais favorável é 50°C (NYANHONGO *et al.*, 2002).

A lacase foi consideravelmente estável em temperaturas elevadas, com perda de somente 50% da atividade inicial após 30 minutos de incubação a 60°C, em ausência do substrato (figura 38). A 45 e 50°C, 79 e 64% de atividade inicial foram preservadas após uma hora, resultados que permitem inferir um considerável período de atuação das lacases no seu ambiente natural, onde as temperaturas são moderadas; deste modo, a enzima atuaria com sucesso em processos nos quais as temperaturas são mais brandas.

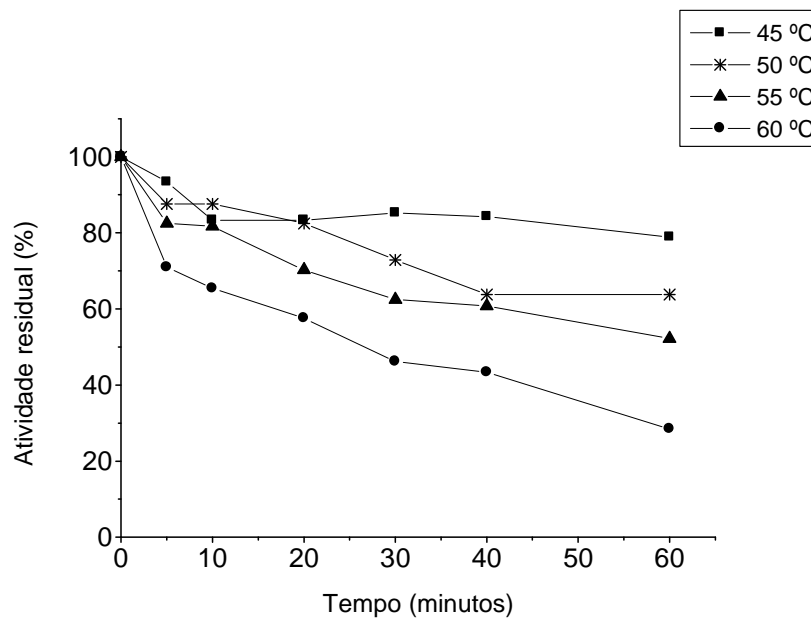


FIGURA 38. Estabilidade térmica da lacase de *Pycnoporus sanguineus* MCA 16.

5.6. METABOLISMO DO DIUROM POR *Pycnoporus sanguineus* EM CULTURA

O metabolismo fúngico de compostos aromáticos é bastante eficiente, e seus produtos primários são quinonas, formadas por ação de lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases, ou fenóis e óxidos de areno resultantes da atividade das enzimas do complexo citocromo P₄₅₀ (CERNIGLIA, 1997). Entretanto, a presença de halogênios como substituintes no anel aromático podem bloquear totalmente estas reações; a ligação carbono-halogênio é extremamente estável e os halogênios bloqueiam os sítios ativos das enzimas por interferência estérica (ATLAS, BARTHA, WESLEY, 1997; RITTMANN, McCARTY, 2001).

A mineralização completa do diurom é possível desde que as condições ambientais sejam favoráveis e a microbiota possua as enzimas e vias metabólicas necessárias, muitas delas dependentes de genes contidos em plasmídeos (RITTMANN, McCARTY, 2001; TURNBULL *et al.*, 2001), de linhagens bacterianas como *Rhodococcus* sp. e *Pseudomonas* sp., geralmente obtidas de culturas de enriquecimento a partir de solos historicamente tratados com feniluréias. Estes organismos são capazes de crescer como diurom como única fonte de carbono (TRAVKIN *et al.*, 2002).

O principal metabólito do diurom, 3,4-dicloroanilina, é resultante da hidrólise direta da cadeia lateral da molécula parental ou de sucessivas dealquilações seguidas de hidrólise (SØRENSEN *et al.*, 2003) (figura 39). Até o momento, a abertura do anel aromático da 3,4-dicloroanilina só foi observada em culturas empregando consórcios microbianos ou procariotos, e não são conhecidos fungos capazes de metabolizar os resíduos aromáticos clorados em cultura pura. Estes microrganismos transformam o diurom por mecanismos co-metabólicos, sendo, portanto dependentes de fontes de carbono e nitrogênio acessórias (BERGER, 1998; BERGER, 1999).

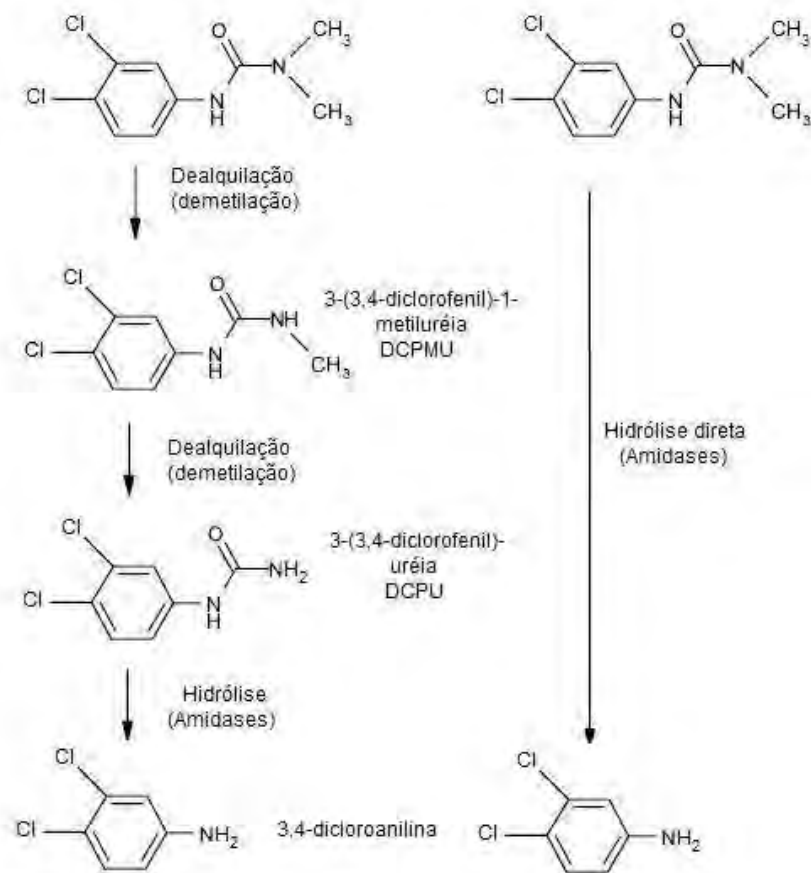


FIGURA 39. Representação esquemática das possíveis vias de degradação microbiana do diurom. Adaptado de Sørensen, 2003.

Nas condições de cultura empregadas, *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 foi capaz de remover 56% do diurom inicialmente presente no meio, após 40 dias (figura 40). A adsorção ao micélio foi de apenas 2,5%, atestando a atividade biológica envolvida no processo. Dentre 100 microrganismos, entre fungos filamentosos e leveduras, avaliados quanto ao potencial para a degradação de feniluréias, a linhagem de *Pycnoporus sanguineus* estudada por Khadrani e colaboradores (1999) foi capaz de remover somente 15% do herbicida, e apenas *Bjerkandera adusta*, *Oxysporus* sp., *Phlebia radiata* e *Trametes* sp. removeram mais de 50% do diurom. Vroumsia e colaboradores (1996), estudando a degradação de clortolurom, diurom

e isoproturom por fungos isolados do solo, entre 90 linhagens testadas, pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, encontraram apenas 6 capazes de degradar mais de 50% do diurom, inicialmente presente no meio na concentração de 20mg.l^{-1} ; estes dados reforçam o potencial biotecnológico da linhagem estudada neste trabalho.

Em experimento anterior (item 5.2) a linhagem removeu apenas 7,5% do diurom após 20 dias, em situação de limitação de nitrogênio. Como neste experimento os valores de biomassa foram bastante superiores ($1,74\text{ g.l}^{-1}$) em relação ao meio com deficiência de nitrogênio ($0,796\text{ g.l}^{-1}$), pode-se inferir que o menor desenvolvimento micelial redundou e uma menor capacidade de metabolismo do xenobiótico.

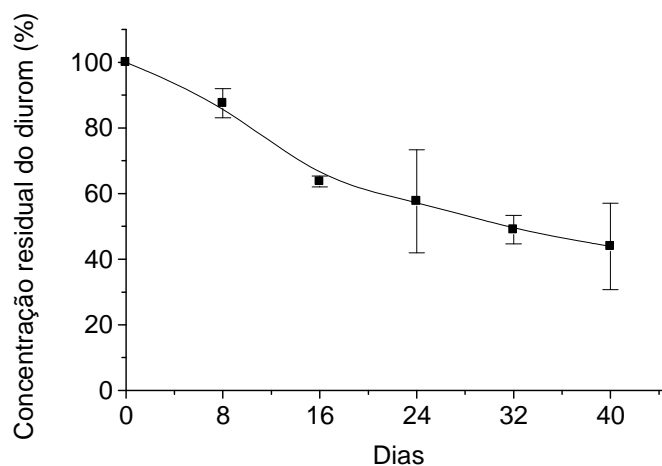


FIGURA 40. Remoção do diurom em culturas de *Pycnoporus sanguineus* MCA 16.

Os cromatogramas dispostos a seguir correspondem aos meios de cultura do fungo *P. sanguineus* sem o herbicida (fig. 41 a), ao meio de cultura com concentração inicial do diurom de 25 mg.l^{-1} (fig. 41 c), e ao controle abiótico, que foi o meio de cultura contendo 25 mg.l^{-1} do diurom e não inoculado, mantido nas mesmas condições dos cultivos (fig. 41 b). As

amostragens foram feitas após 40 dias de incubação a 28°C. O pico de maior área observado nos cromatogramas correspondeu a interferência da fase móvel ou a algum componente persistente no meio de cultura, presente inclusive nos extratos dos controles abióticos (figura 41a). O pico número 2 (figura 41b) pertence ao diurom, com tempo de retenção de 4,92 minutos. Na figura 41 c, é nitidamente observada redução do pico correspondente ao herbicida e concomitante surgimento de dois novos picos de substâncias mais polares que o diurom, com menores tempos de retenção: 4,09 e 3,48 minutos. Os picos, nomeados 3 e 4, provavelmente são metabólitos ainda possuindo o anel aromático, já que absorveram radiação UV a 240nm.

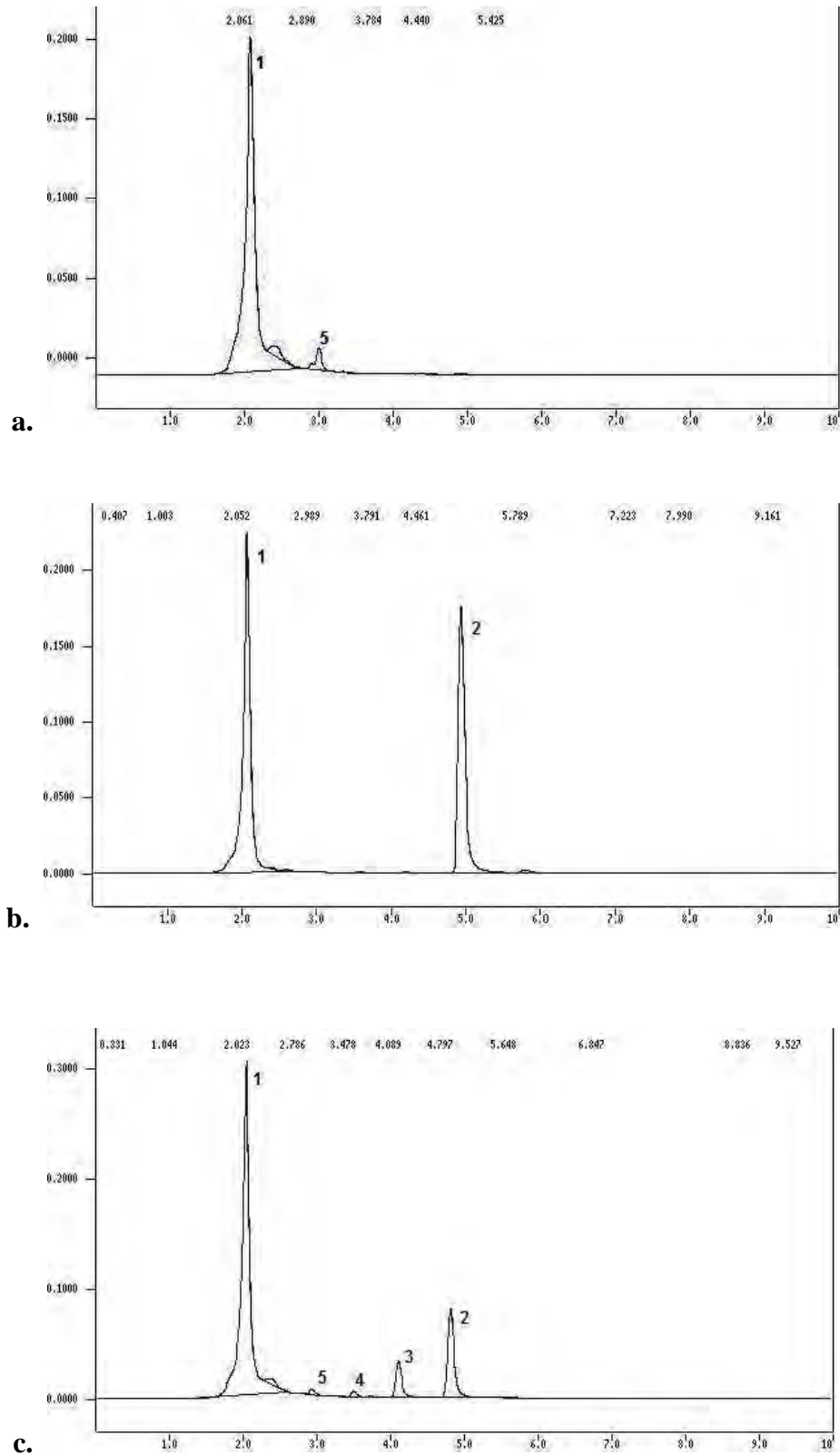


FIGURA 41. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA 16, em ausência (a) e em presença do diurom (c). O gráfico b representa o controle não inoculado do meio contendo diurom. Picos 1: composto desconhecido inerente ao meio de cultura; pico 2: diurom; picos 3 e 4: prováveis metabólitos residuais do diurom; pico 5: composto desconhecido produzido pelo fungo.

A oxidação via citocromo P₄₅₀, peroxidases e polifenoloxidasas é, freqüentemente, o primeiro passo na detoxificação de xenobióticos, resultando em hidroxilação da molécula parental, muitas vezes reduzindo sua toxicidade e aumentando sua polaridade e solubilidade em água, o que favorece os passos seguintes do seu metabolismo (EERD *et al.*, 2003). É provável que os picos 3 e 4 na figura 41 c sejam produtos da fase I do metabolismo de moléculas tóxicas.

Embora incapazes de mineralizar totalmente o diurom, os fungos podem desempenhar um papel importante na sua degradação em áreas contaminadas; muitos dos metabólitos produzidos por fungos – intermediários mono e didemetilados e 3,4-dicloroanilina – (TIXIER *et al.*, 2000) são metabolizados com mais eficiência pelas bactérias da microbiota local, acelerando o processo de degradação (SØRENSEN *et al.*, 2003). Além disto, no solo, a 3,4 dicloroanilina formada pode ser complexada com substâncias húmicas, tornando-se não biodisponível (KEARNEY, PLIMMER, 1972).

5.7. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO DIUROM *in vitro* PELA LACASE DE *P. sanguineus*

A exemplo do que ocorre para muitos outros fungos basidiomicetos, como *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (FRATILA-APACHITEI *et al.*, 1999) e *Trametes versicolor* (MOUGIN, KOLLMANN, JOLIVALT 2002), a presença do diurom e outros xenobióticos interferiu no crescimento e induziu a produção de enzimas ligninolíticas.

As lacases, particularmente, estão envolvidas na degradação de fosforotiolatos, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e poluentes aromáticos diversos (AMITAI *et al.*, 1998; KEUM, LI, 2004; JOHANNES, MAJCHERCZYK, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). A fim de verificar se as lacases induzidas em *Pycnoporus sanguineus* estão implicadas no processo de degradação do xenobiótico, o extrato enzimático bruto foi incubado, nas condições ótimas de atuação da enzima (pH 2,5 e 55°C), com diurom em solução (20 mg.l⁻¹), por até 24 horas. Também foram avaliados os efeitos do pH neutro (7,0) ou da presença do mediador ABTS, na concentração de 0,03%, no potencial da lacase em remover o diurom.

Embora a enzima tenha sido bastante estável nas condições de ensaio, restando 21% da atividade após 6 horas de reação e 2,7% da atividade após 24 horas, nenhuma redução da concentração do diurom foi observada nas análises em HPLC. Portanto, a exemplo de outros microrganismos como *Bjerkandera adusta* e *Pleurotus ostreatus*, que removeram PHAs do meio de cultura sem qualquer relação com a produção de enzimas ligninolíticas (SCHÜTZENDÜBEL *et al.*, 1999), pode-se inferir que a biotransformação do diurom por *Pycnoporus sanguineus* é um processo independente das enzimas lacase e outras ligninases presentes no extrato enzimático bruto e está associada à biomassa.

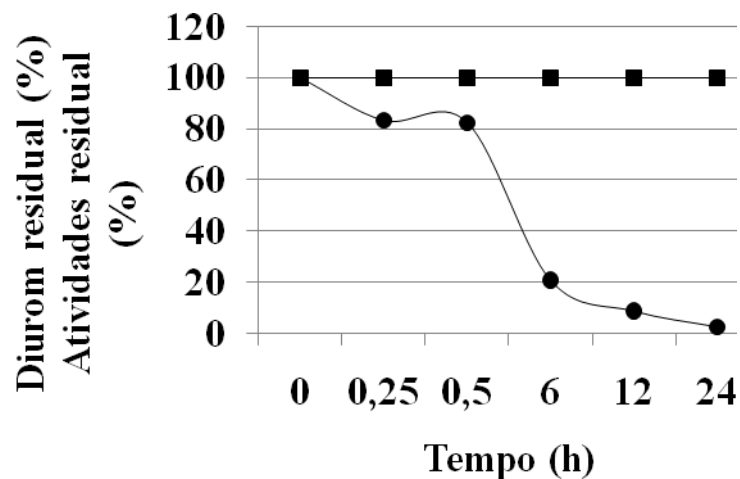


FIGURA 42. Concentração do diurom (■) e atividade residual da lacase (●) de *P. sanguineus* após incubação em sistema de reação empregando ABTS como mediador, a 40°C. As amostras para análise foram retiradas após 15 e 30 minutos e 6, 12 e 24 horas de incubação.

5.8. FERMENTAÇÃO DE SUPERFÍCIE DOS FUNGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ATRAZINA

À semelhança dos testes realizados com o diurom, as linhagens consideradas mais promissoras com base na tolerância à atrazina, *Polyporus tenuiculus* MCA 11 e *Pluteus cubensis* SXS 320 foram cultivadas em diferentes concentrações do herbicida como única fonte de carbono, ou com glicose ou bagaço de cana como fontes acessórias. A linhagem *P. cubensis* cresceu em glicose e bagaço de cana, mas não produziu nenhuma das enzimas ligninolíticas, enquanto *P. tenuiculus* apresentou níveis muito baixos de lacase nos meios com glicose, indicando que a enzima deste microrganismo é sujeita à repressão catabólica (figura 43). Mesmo assim, a atrazina exerceu algum grau de indução sobre a síntese das lacases, a exemplo do que ocorreu para *Trametes versicolor* (MOUGIN, KOLLMANN, JOLIVALT,

2002), fungo cuja produção constitutiva de lacases foi baixa, mas induzida por uma série de xenobióticos, incluindo a atrazina. O herbicida não afetou o crescimento do fungo, considerando os valores muito semelhantes de biomassa encontrados em todos os cultivos.

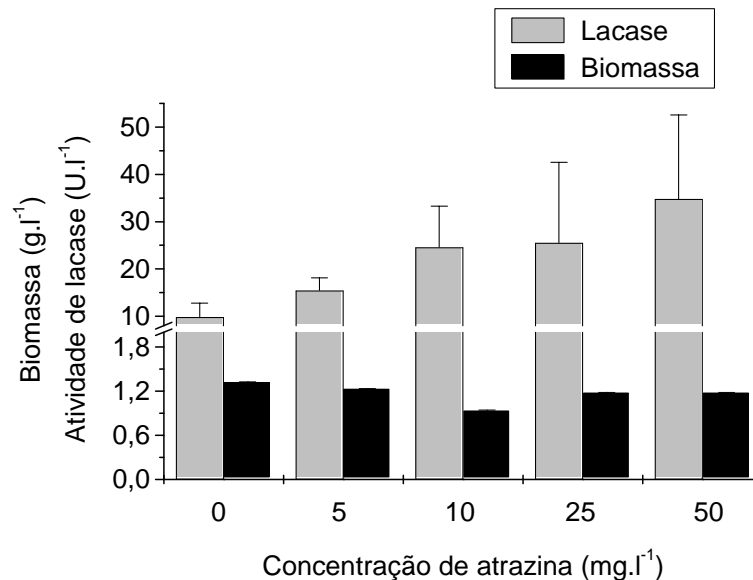


FIGURA 43: Desenvolvimento de *Polyporus tenuiculus* MCA 11 e produção de lacases em meio contendo 1% de glicose como fonte de carbono e diferentes concentrações de atrazina.

Em meio contendo 1% de bagaço de cana, a produção de lacase atingiu 688 U.l⁻¹, nos meios com 5 mg.l⁻¹ de atrazina, aos 20 dias de cultivo estático a 28°C (figura 44). A indução das enzimas ligninolíticas por substratos lignocelulósicos abundantes e baratos como bagaços e farelos é um aspecto bastante positivo, quando se tem em vista processos de biorremediação. Esses compostos podem ser utilizados como agentes de corpo ou “bulking agents”, servindo como substrato na produção de inóculo nos procedimentos de bioaugmentação, quando se usa fungos filamentosos como agentes de biorremediação (MEYSAMI, BAHERI, 2003; MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004). Na figura 45 estão representados os resultados de um experimento delineado para ampliar a visão sobre o

potencial dos substratos vegetais e outras condições de cultura favoráveis à produção de ligninases sobre a indução da produção das enzimas.

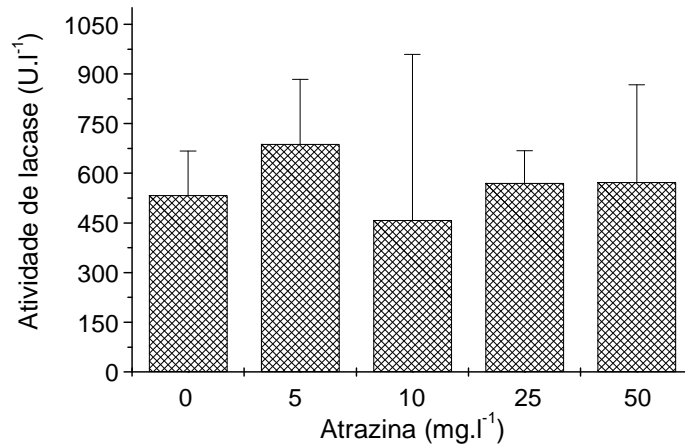


FIGURA 44: Produção de lacases por *Polyporus tenuiculus* MCA 11 em meio suplementado com 1% de bagaço de cana e diferentes concentrações de atrazina, após 20 dias de cultivo a 28°C.

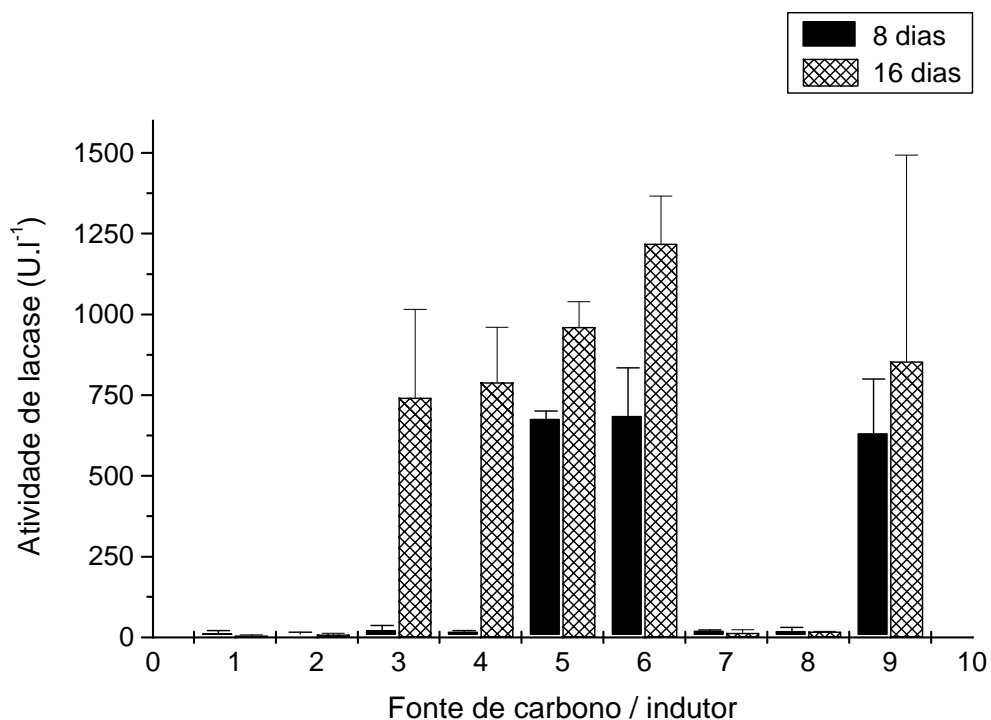


FIGURA 45. : Produção de lacases por *P. tenuiculus* após 20 dias em diferentes composições de meio de cultivo. 1 e 2: 1% de glicose, e deficiência ou suficiência de nitrogênio, respectivamente; 3 e 4: 1% de bagaço de cana e deficiência ou suficiência de nitrogênio; 5 e 6: 1% de farelo de trigo e deficiência ou suficiência de nitrogênio; 7, 8 e 9: meios contendo 1% de glicose e suficiência de nitrogênio, e Mn^{+2} , álcool veratrílico e chá mate, respectivamente.

A presença de 50 mM de álcool veratrílico (ARORA, GILL, 2001b) ou 20 ppm de Mn^{+2} (TEKERE, ZVAUYA, READ, 2001), ou ainda a limitação de nitrogênio no meio de cultura a níveis não superiores a 2,5mM (KEYSER, KIRK, ZEYKUS, 1978) são fatores freqüentemente apontados como indutores ou condições favoráveis à síntese das enzimas ligninolíticas, incluindo as lacases. Nos testes com a linhagem *P. tenuiculus*, MCA 11, nenhum destes elementos alterou a expressão das enzimas e relação ao baixo nível de produção constitutiva. A única indução foi observada em presença de bagaço de cana e farelo de trigo, substratos lignocelulósicos naturais, e de folhas de mate torrado comercial, que além da constituição fibrosa possui teor reconhecidamente elevado de polifenóis. Aos 8 dias de cultivo, a produção de lacases foi muito semelhante nestes substratos, de 677, 685 e 632 U.l⁻¹, respectivamente. O farelo de trigo proporcionou a melhor produção enzimática, atingindo 1.219 U.l⁻¹, aos 16 dias de cultivo, e a enzima produzida nestas condições foi utilizada nos ensaios de caracterização.

5.9. CURVA DE CRESCIMENTO DE *Polyporus tenuiculus* MCA 11 E *Pluteus cubensis* SXS 320

A fim de verificar a ocorrência de degradação da atrazina acompanhada ou não da síntese de enzimas ligninolíticas, os fungos foram cultivados em condições de suficiência de carbono e nitrogênio. As figuras 46 e 47 a e b exibem os resultados obtidos para a biomassa e depleção da glicose do meio. Nas condições de cultivo empregadas, não foi observada

produção de lacases em nenhum momento dos 40 dias de duração do experimento, para ambos os fungos.

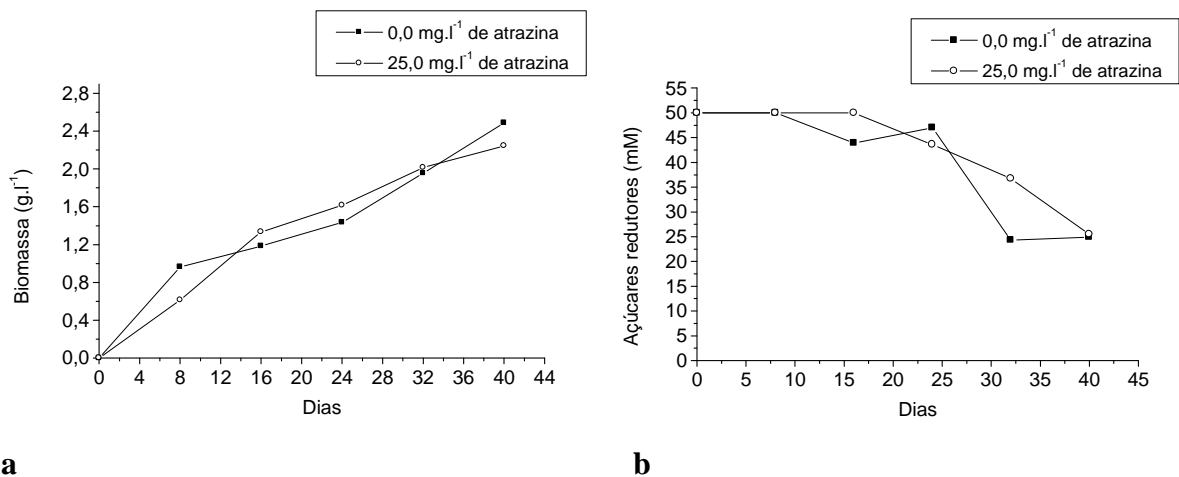


FIGURA 46: Crescimento (a) e consumo de açúcares no meio (b) por *Polyporus tenuiculus* MCA 11 ao longo de 40 dias de cultivo estacionário a 28°C, empregando meio sintético de Kirk e colaboradores, e 1% de glicose como fonte de carbono.

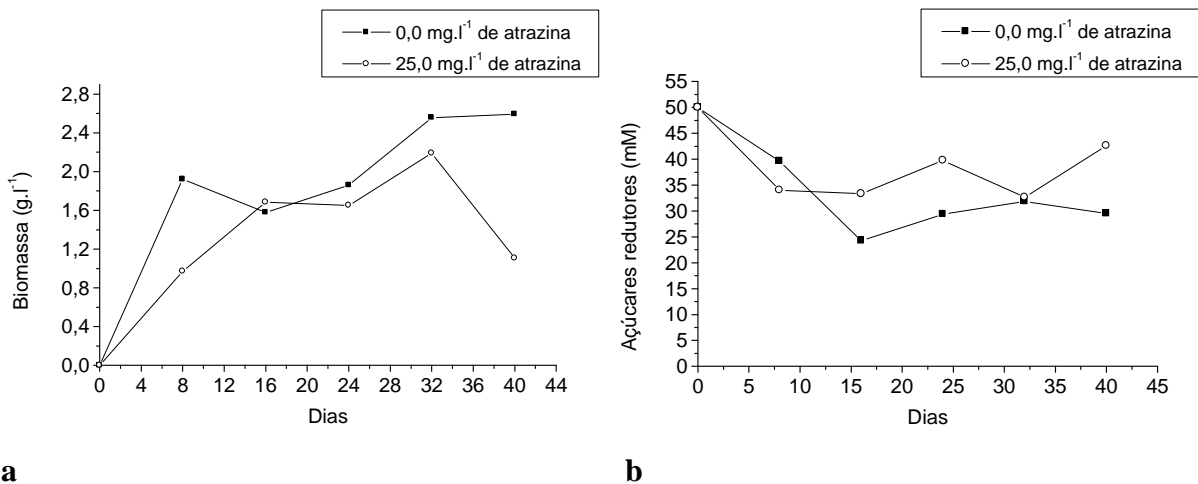


FIGURA 47: Crescimento(a) e consumo de açúcares do meio (b) por *Pluteus cubensis* SXS 320 ao longo de 40 dias de cultivo estacionário a 28°C, empregando meio sintético de Kirk e colaboradores, e 1% de glicose como fonte de carbono.

Nos solos que recebem aplicações de atrazina, o principal metabólito encontrado é geralmente a hidroxiatrazina, composto desclorado, geralmente resultante de reações abióticas ou anaeróbias. Outros compostos são encontrados em culturas de fungos e bactérias que não possuem enzimas para o catabolismo completo da molécula, como linhagens de *Rhodococcus* sp., capazes de catalisar a remoção de grupos etil e isopropil da molécula da atrazina (BEHKI *et al.*, 1995). A linhagem de *Pseudomonas* sp. ADP é considerada referência no estudo das rotas de degradação da atrazina: possui genes denominados atzA, atzB, atzC e atzD, que codificam enzimas responsáveis pela mineralização aeróbia do composto (MANDELBAUM, ALLAN, WACKET, 1995; RALEBITSO, SENIOR, VERSEVELD, 2002), conforme representado na figura 48.

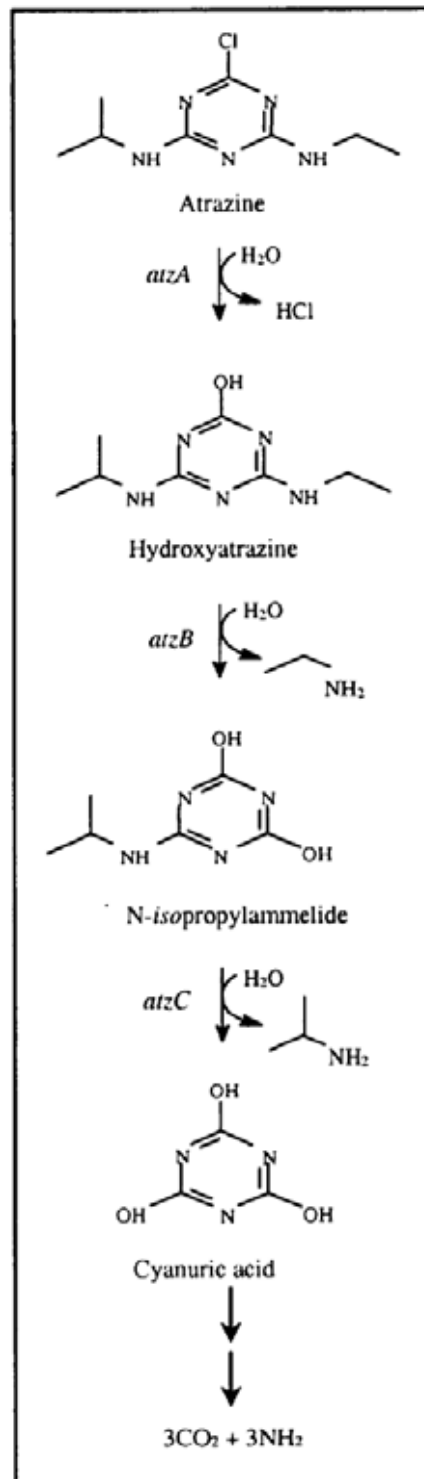


FIGURA 48: Via degradativa hidrolítica da atrazina, elucidada para a linhagem bacteriana *Pseudomonas* sp. linhagem ADP. Cada passo da via é catalisado por uma enzima codificada pelos genes atz (RALEBITSO, SENIOR, VERSEVALD, 2002).

A degradação da atrazina por fungos geralmente segue vias bioquímicas que envolvem a remoção seqüencial de substituintes do anel aromático, iniciando pela dealquilação, primeiro e principal passo da via metabólica do composto (MOUGIN *et al.*, 1994; 1997). Embora estudos evidenciem a liberação de ^{14}C em moléculas de atrazina marcadas, na forma de CO_2 , tais estudos foram conduzidos usando palha de trigo pasteurizada como substrato para crescimento, de forma que é impossível excluir a participação de bactérias (MASAPHY, LEVANON, HENIS, 1996). As linhagens fúngicas mais estudadas no que concerne ao metabolismo da atrazina, *Pleurotus pulmonarius* e *Phanerochaete chrysosporium*, degradaram a atrazina até de-etilatrazina, de-isopropilatrazina e de-etil-isopropilatrazina e hidroxiatrazina (MOUGIN *et al.*, 1994; MASAPHY *et al.*, 1993).

Para as linhagens estudadas no presente trabalho, a degradação da atrazina atingiu um máximo de 39,12% aos 40 dias, nas culturas de *P. tenuiculus*, com evidências da formação de metabólitos mais polares (figura 49 c). Apenas 2,85% foram encontrados adsorvidos à biomassa.

Nas culturas de SXS 320, *P. cubensis*, a remoção da atrazina atingiu 20,7% após 40 dias. Deste montante, 4,46% ficaram adsorvidos à biomassa. Um pequeno pico (número 6, figura 50 c) com tempo de retenção de 3,33 minutos foi encontrado apenas nas culturas contendo a atrazina e o microrganismo. Na comparação entre os cromatogramas, parece tratar-se de um metabólito resultante da degradação, também mais polar (figura 50 c). É característica comum ao metabolismo de xenobióticos, inclusive por microrganismos, a transformação em compostos mais polares.

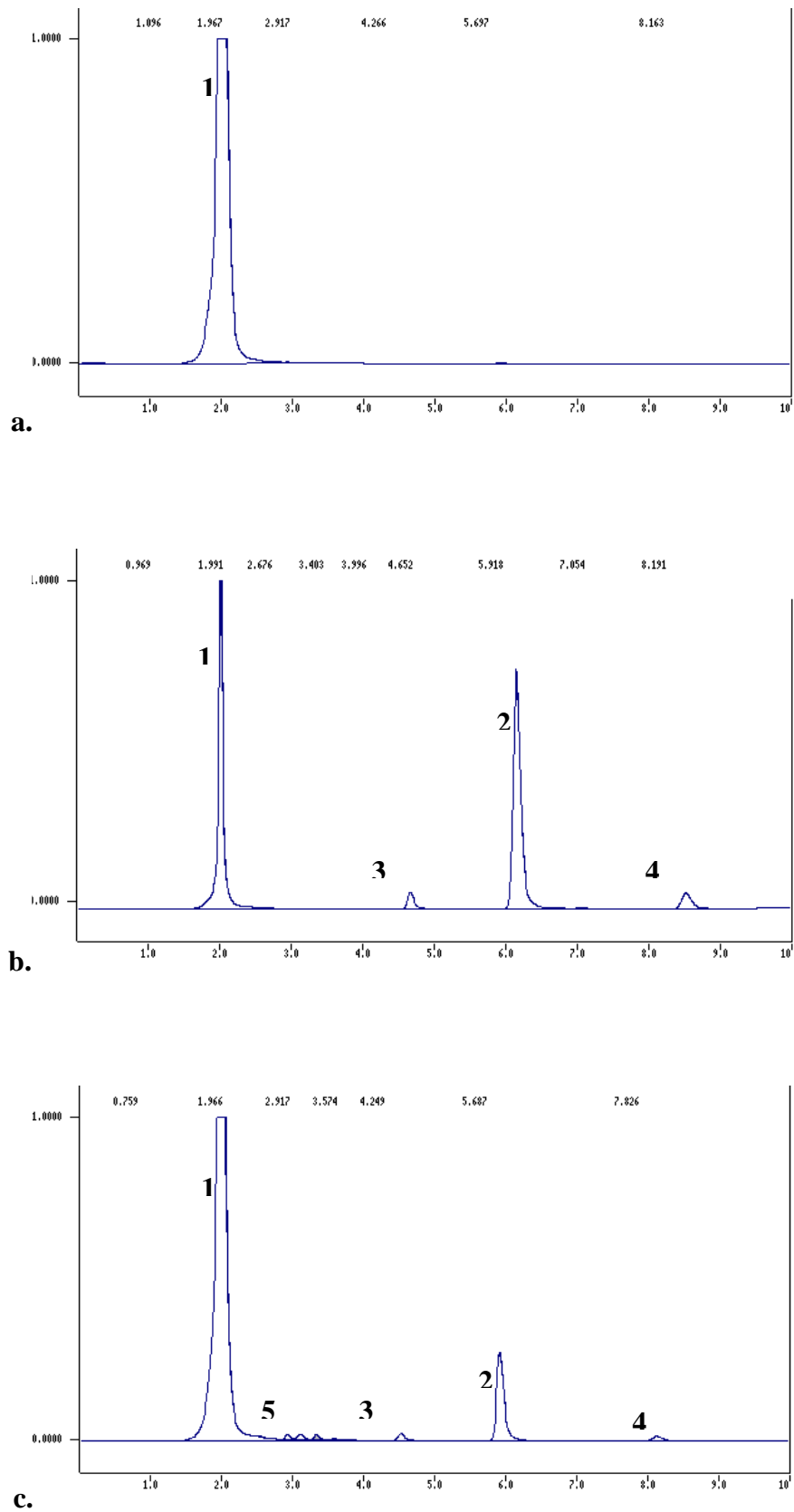


FIGURA 49. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo *Polyporus tenuiculus* MCA 11, em ausência (a) e em presença da atrazina (c). O gráfico b representa o controle não inoculado do meio contendo atrazina. Pico 1: composto desconhecido inerente ao meio de cultura ou fase móvel; pico 2: atrazina; picos 3 e 4: contaminantes presentes na formulação comercial da atrazina; picos 5: possíveis metabólitos da atrazina.

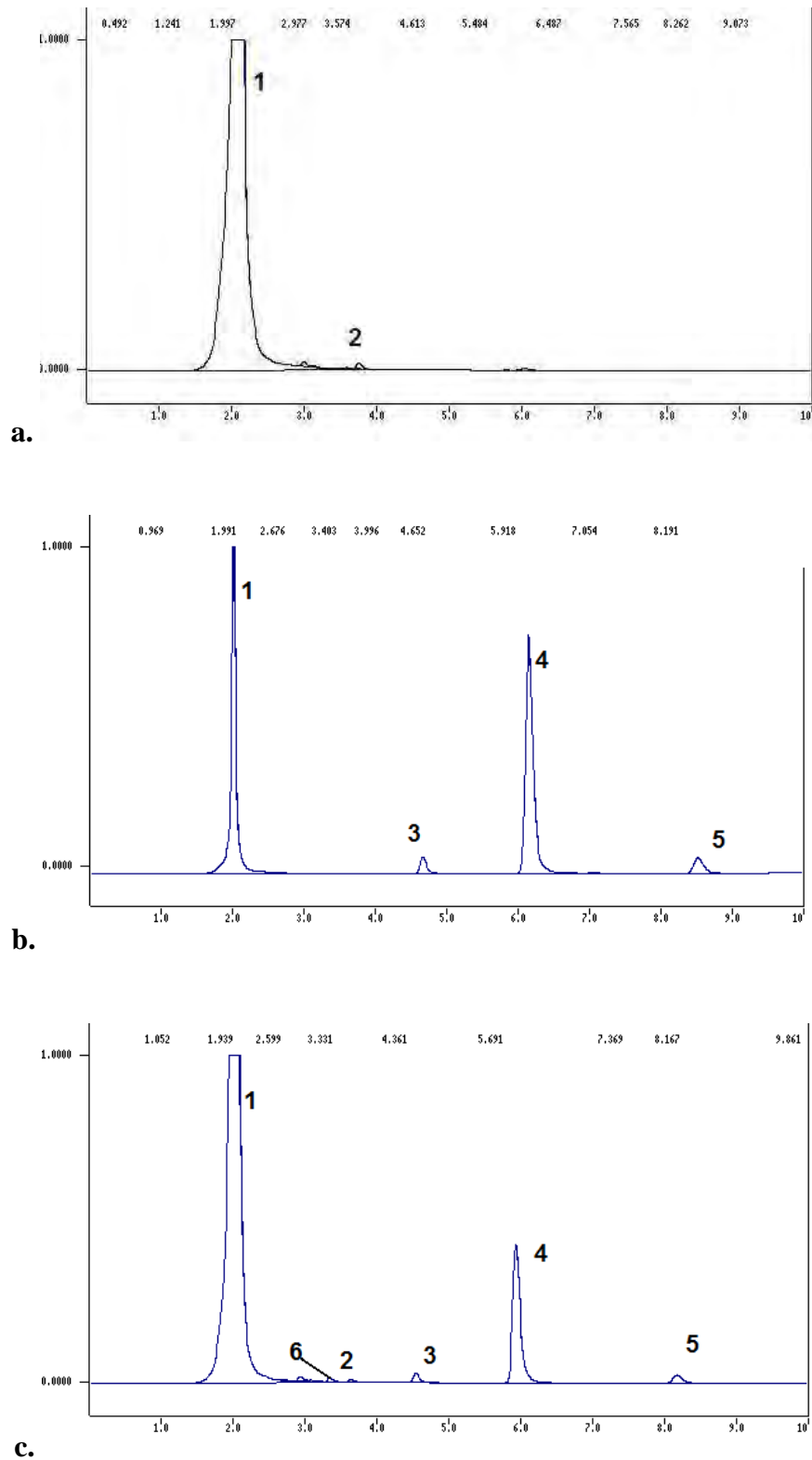


FIGURA 50. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo *Pluteus cubensis* SXS 320, em ausência (a) e em presença da atrazina (c). O gráfico b representa o controle não inoculado do meio contendo atrazina. Picos 1 e 2: composto desconhecido inerente ao meio de cultura ou fase móvel; pico 4: atrazina; picos 3 e 5: contaminantes presentes na formulação comercial da atrazina; pico 6: possíveis metabólitos da atrazina.

Os ensaios realizados revelaram, para a linhagem SXS 320, um perfil peculiar no metabolismo de xenobióticos. Conforme apresentado na tabela 4, o fungo produziu alterações químicas mais intensas na atrazina em meio com deficiência de nitrogênio (2,5 mM), degradando 30% desta após 20 dias de cultivo. Em condições idênticas de cultivo e alta concentração de NH_4NO_3 (25 mM de nitrogênio), o fungo removeu apenas 20,7% após 40 dias (figura 51). Os cromatogramas evidenciam também um acúmulo mais intenso de metabólitos (tempo de retenção de 2,98 e 3,40 minutos) nas culturas com insuficiência de nitrogênio: as áreas dos picos nesta condição (figura 51 c) têm aproximadamente o dobro do tamanho daquelas que aparecem nas culturas com nitrogênio abundante (figura 51 b). Contrariando evidências da dependência direta em relação ao volume de biomassa e enzimas associadas, para a degradação da atrazina, verificada para outros fungos (MOUGIN *et al.*, 1997), a deficiência de nitrogênio parece ter impulsionado o metabolismo da atrazina, herbicida intensamente nitrogenado, por *Pluteus cubensis*.

A linhagem *P. cubensis* SXS 320 foi também capaz de remover mais de 96% do diurom do meio de cultivo, consumindo o resíduo já presente na formulação comercial do herbicida (pico 3, figura 52), sem produzir metabólitos adicionais. A adsorção do diurom ao micélio foi negligenciável, de forma que se pode inferir um metabolismo extremamente eficiente e um elevado potencial para emprego em biorremediação do microrganismo em estudo.

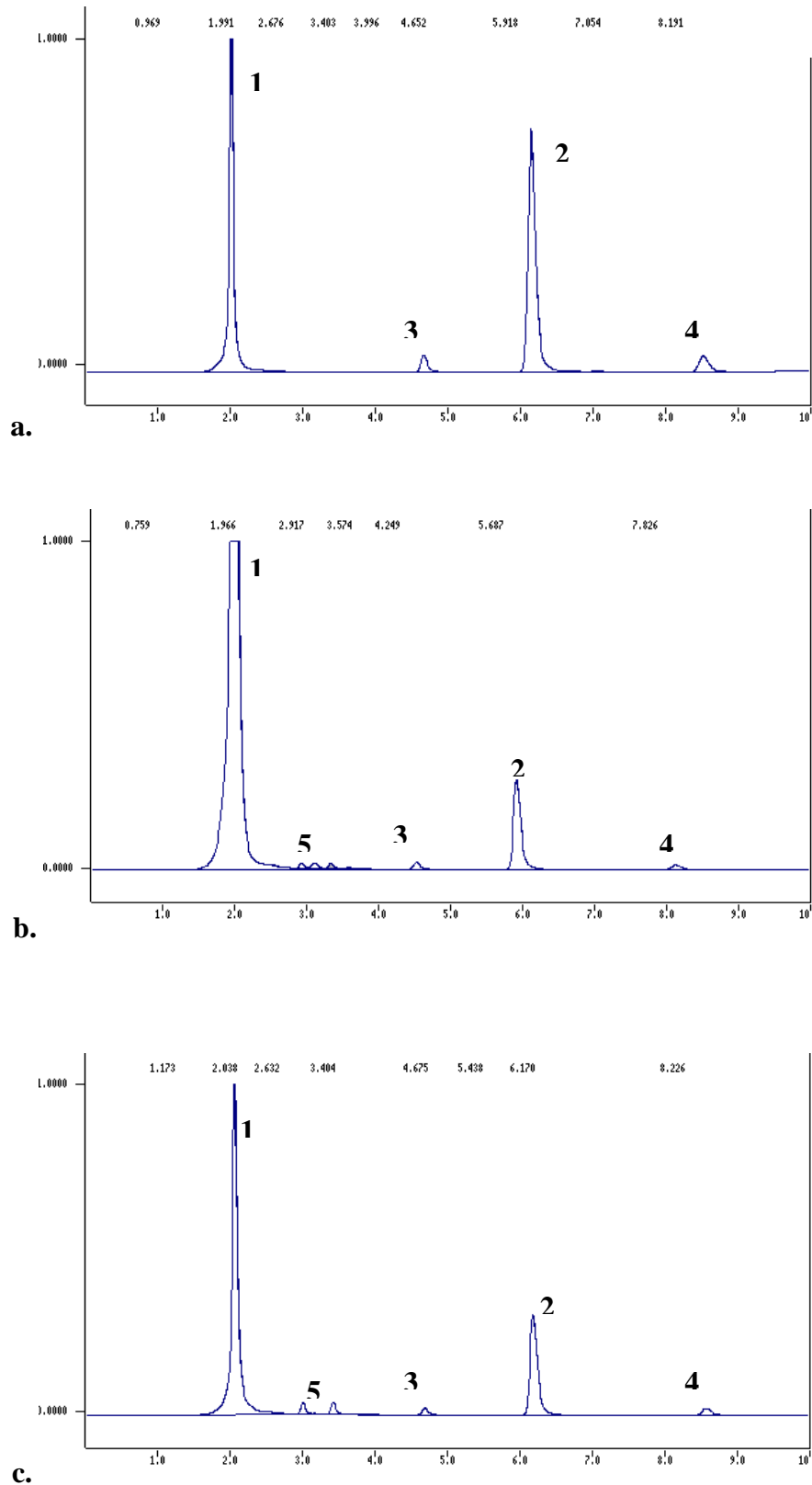


FIGURA 51. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo *Pluteus cubensis* SXS 320, com alta concentração de N após 40 dias (b) e baixa concentração de N após 20 dias (c). O gráfico a representa o controle não inoculado do meio contendo atrazina. Pico 1: composto desconhecido inerente ao meio de cultura ou fase móvel; pico 2: atrazina; picos 3 e 4: contaminantes presentes na formulação comercial da atrazina; picos 5: possíveis metabólitos da atrazina.

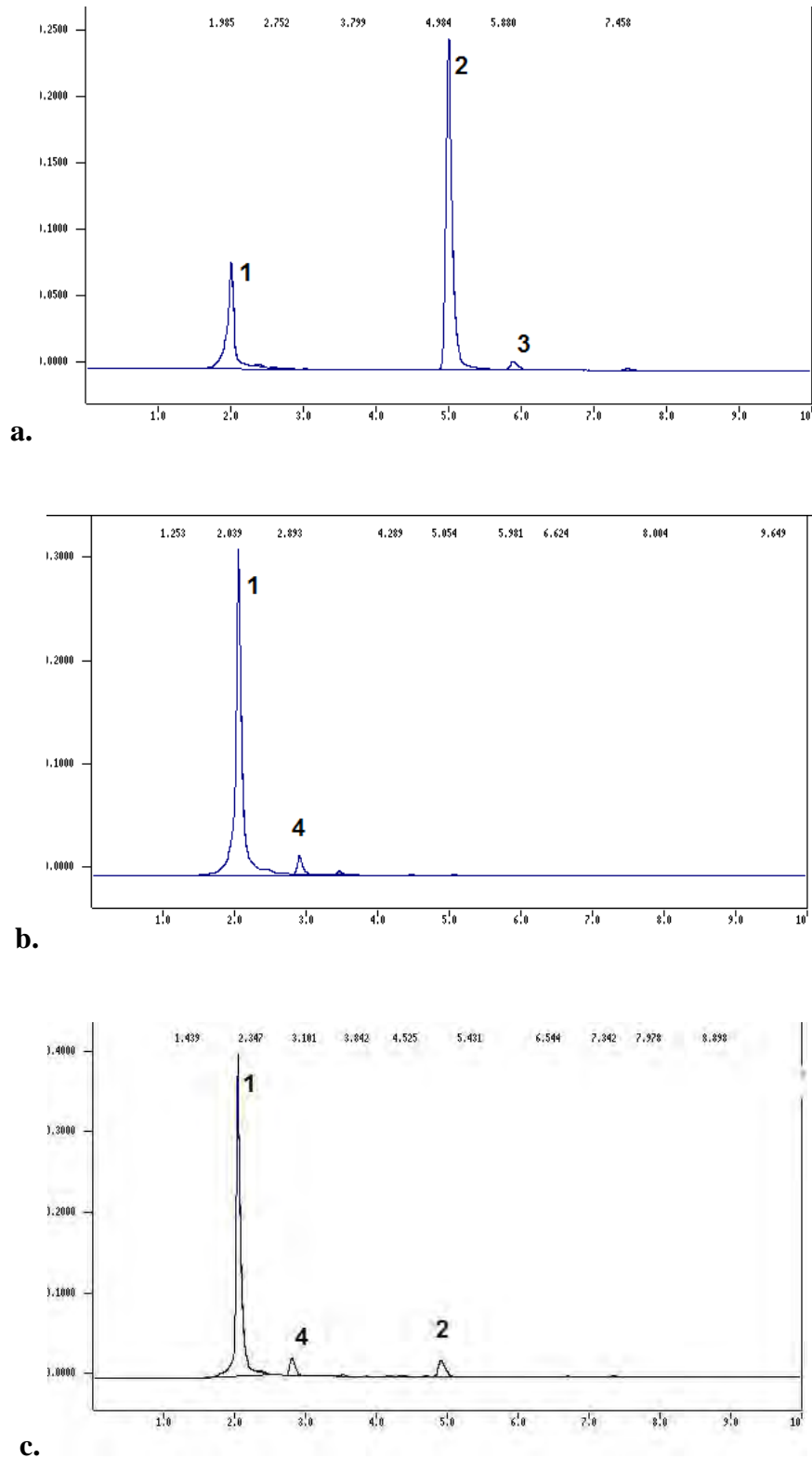


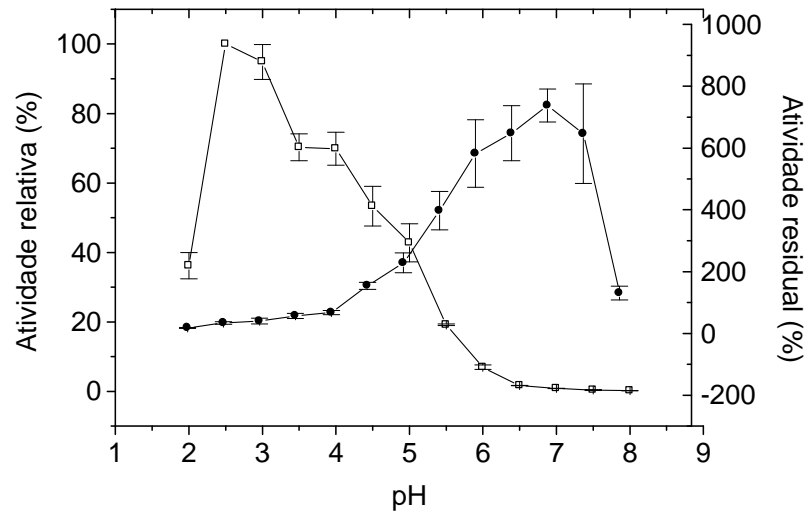
FIGURA 52. Análise cromatográfica dos extratos obtidos pelo crescimento do fungo *Pluteus cubensis* SXS 320, após 20 dias em meio com deficiência de nitrogênio e diurom. O gráfico **a** representa o controle não inoculado do meio contendo o herbicida; o gráfico **b** foi obtido de culturas de SXS 320 em meio sem diurom. Pico 1: composto desconhecido inerente ao meio de cultura ou fase móvel; pico 2: diurom; pico 3 e contaminante presente na formulação comercial do diurom. No cromatograma **c** fica clara a redução do pico do herbicida, de número 2, e o desaparecimento do pico 3, resíduo do diurom inicialmente presente.

5.10. CARACTERIZAÇÃO DA LACASE PRODUZIDA POR *Polyporus tenuiculus*

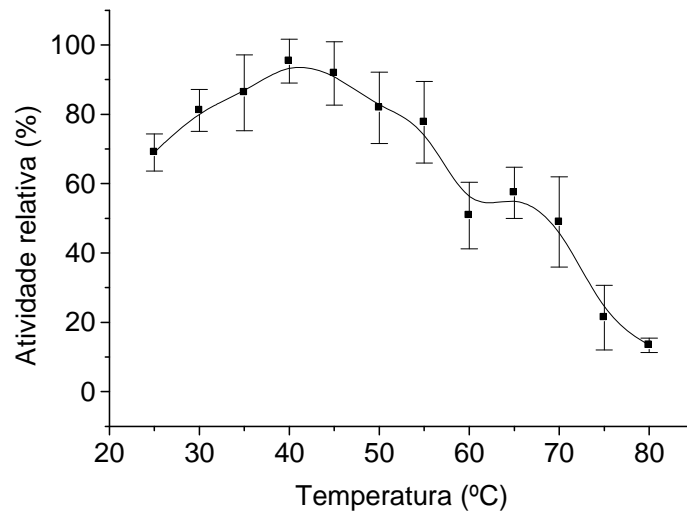
MCA 11

A caracterização bioquímica da lacase *Polyporus tenuiculus* revelou uma enzima com características mesofílicas, semelhante em muitos aspectos àquela produzida por *Pycnoporus sanguineus* MCA 16. O pH ótimo de atividade (figura 53 a), determinado como 2,5, é semelhante ao da maioria das lacases fúngicas, em razão do mecanismo catalítico já discutido anteriormente (BALDRIAN, 2006).

O teste de estabilidade em ausência do substrato em diferentes pH revelou um dado surpreendente: enquanto a maioria das lacases mantém suas propriedades catalíticas em condições acídicas (BALDRIAN, 2006), a lacase de *P. tenuiculus* perdeu cerca de 60% da atividade após 24 horas em pH inferior a 3; e diferente das lacases de *Pleurotus ostreatus* (PALMIERI *et al.* 1997) e *Melanocarpus albomyces* (KIISKINEN, VIIKARI, KRUUS, 2002), por exemplo, que têm maior estabilidade em pH acima de 4,5, a enzima em estudo, além de estável, sofreu incremento da capacidade catalítica, com atividade 737% superior àquela verificada no extrato bruto após 24 horas em pH 7 (figura 53 a). Este efeito pode ser resultado de uma distribuição de cargas mais favorável à manutenção da conformação nativa da proteína em condições neutras (NELSON, COX, 2006); o pH observado do extrato bruto, entre 4,5 e 5,0, já se encontra na faixa onde ocorre estabilidade.



a.



b.

FIGURA 53: Propriedades da lacase de *Polyporus tenuiculus* MCA 11. a: efeito do pH sobre a atividade enzimática (□), e estabilidade da enzima quando incubada em ausência de substrato por 24 horas (●). b: efeito da temperatura sobre a atividade da enzima.

Em relação ao efeito da temperatura (figura 53 b) sobre a atividade, mais de 70% da atividade foram retidos na ampla faixa entre 25 e 55°C, com pico situado a 40°C; a lacase

também se mostrou bastante termoestável, mantendo mais de 70% da atividade catalítica após 60 minutos de incubação à 60°C (figura 54). Conforme ressaltado por Kiiskinen, Viikari e Kruus (2002), a combinação de alta estabilidade térmica e de pH é rara entre as lacases fúngicas, o que denota uma grande versatilidade da enzima em relação à aplicações biotecnológicas.

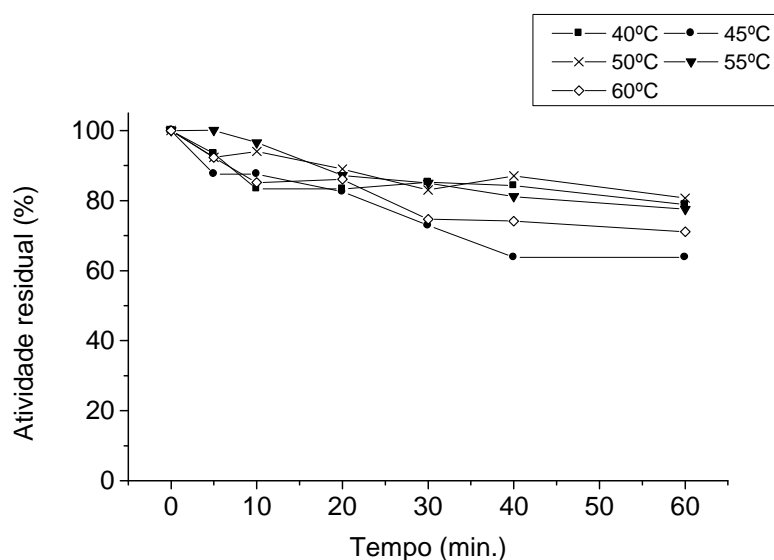


FIGURA 54: Termoestabilidade da lacase de *Polyporus tenuiculus* MCA 11.

A alta termoestabilidade lhe confere potencial para aplicações no tratamento de xenobióticos em reatores que operam a altas temperaturas ou no solo, onde esta variável oscila bastante (GIANFREDA, MORA, DIEZ, 2006).

5.11. ATUAÇÃO DAS LACASES DE MCA 11 SOBRE A ATRAZINA *in vitro*

Embora seja por vezes uma tarefa complexa atestar o envolvimento de uma determinada enzima na degradação de um xenobiótico, são abundantes as evidências de atuação das lacases sobre uma ampla variedade de moléculas tóxicas, inclusive a atrazina. Exemplo é o trabalho de Gorbatova e colaboradores (2006), que verificaram uma produção de lacases mais intensa quando os fungos *Coriolus hirsutus*, *Coriopsis fulvocinerea* e *Cerrena maxima* foram cultivados em meio contendo atrazina.

Uma vez que a linhagem *Polyporus tenuiculus* MCA 11, além de tolerante à presença da atrazina no meio, induzida pela presença de substratos lignocelulósicos produz elevadas quantidades de lacases estáveis frente uma grande amplitude de potenciais iônicos e temperaturas elevadas, foi avaliado o potencial de atuação de tais enzimas sobre a atrazina.

Os ensaios foram conduzidos *in vitro* nas condições físico-químicas ideais para atuação enzimática (pH 2,5 e 40°C). Após 0, 15 e 3 minutos, e 6, 12 e 24 horas, alíquotas da reação foram retiradas e congeladas para análise em HPLC. Paralelamente, a enzima mantida no banho nas mesmas condições da reação teve sua atividade residual determinada.

Embora a enzima tenha sido extremamente estável nas condições de reação (88% de atividade após 6 horas de incubação) não foi detectada qualquer alteração na concentração inicial da atrazina incubada com a lacase (figura 55). Mesmo ligninases induzidas pelos herbicidas podem não ser as responsáveis por eventual degradação; isto já foi observado no caso da N-degradação da atrazina por *Pleurotus pulmonarius* (MASAPHY *et al.*, 1997) e *Phanerochaete chrysosporium* (MOUGIN *et al.*, 1997), ou para a degradação do diurom por *P. sanguineus* MCA 16, neste trabalho. Nestes casos, a indução é um efeito fortuito, e o

metabolismo dos xenobióticos provavelmente segue rotas de detoxificação intracelular, ou envolvendo outras enzimas / cofatores associados às membranas celulares, que poderiam inclusive atuar sinergicamente com a lacase.

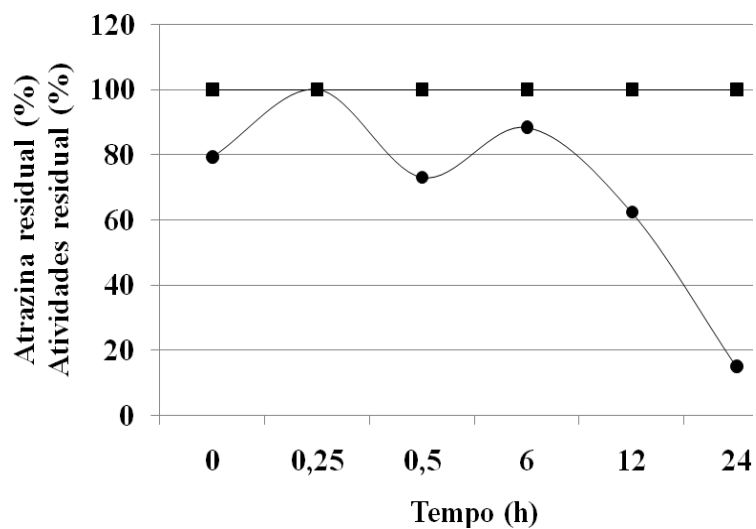


FIGURA 55. Concentração da atrazina (■) e atividade residual da lacase (●) de *P.tenuiculus* após incubação em sistema de reação empregando ABTS como mediador, a 40°C. As amostras para análise foram retiradas após 15 e 30 minutos e 6, 12 e 24 horas de incubação.

6. CONCLUSÕES

- O diurom exerceu maior toxicidade para os fungos basidiomicetos em relação à atrazina, mas ambos os herbicidas alteraram significativamente o desenvolvimento dos fungos em meio sólido, na dose de campo;
- Com base na porcentagem de inibição, vigor micelial e velocidade de crescimento em meio sólido, foram selecionadas as linhagens *P. sanguineus* MCA 16 e *D. elegans* SXS 323 para continuidade dos estudos com o diurom, e *Pluteus cubensis* SXS 320 e *Polyporus tenuiculus* MCA 11 para os ensaios com a atrazina;
- Nos ensaios em cultura líquida, ambos os herbicidas foram resistentes à degradação e perturbaram o desenvolvimento fúngico de diversas formas. Após 20 dias de cultivo, a atrazina apresentou-se mais biodegradável por fungos basidiomicetos, enquanto o diurom atuou mais eficazmente como indutor da produção de lacases, sendo degradado com muita eficiência por microrganismos fisiologicamente aptos (até 96,7%). No entanto, apenas 4 microrganismos das 13 linhagens testadas produziram lacases, única ligninase detectada nas condições de cultivo e metodologia empregadas.
- *P. sanguineus* apresentou bom crescimento na presença do diurom, e a produção de lacases foi induzida em cerca de 37% na presença de 25mg.l⁻¹ do xenobiótico; apenas níveis baixos de manganês peroxidases e nenhuma atividade de lignina peroxidase puderam ser detectados.

- A linhagem *P. sanguineus* reduziu em 56% a concentração do diurom no meio após 40 dias de cultivo; no entanto, ensaios com o extrato bruto não puderam evidenciar a participação da lacase ou outros elementos secretados para o meio no processo, apontando para rotas intracelulares de detoxificação, para a atuação de outras enzimas ligadas à parede celular, ou mesmo produzidas e secretadas para o meio em momentos distintos daqueles em que as dosagens foram realizadas.
- As linhagens *P. cubensis* e *P. tenuiculus* degradaram, respectivamente, 20,7 e 39,85% da atrazina do meio, por co-metabolismo, após 40 dias de cultura. Em ambos os casos as análises em HPLC evidenciaram metabólitos mais polares em relação ao composto parental.
- A limitação de nitrogênio no meio de cultivo estimulou a degradação por SXS 320, enquanto interferiu negativamente na degradação por MCA 11;
- A linhagem *P. cubensis* se revelou particularmente promissora para trabalhos de biorremediação envolvendo os herbicidas estudados, tendo em vista a alta taxa de remoção da atrazina e do diurom dos meios de cultura, chegando mesmo a degradar 96% do diurom inicial em 20 dias, sem deixar resíduos. Tais evidências são muito positivas, merecendo estudos metabólicos mais minuciosos.
- Os parâmetros bioquímicos ótimos determinados para as lacases de *P. tenuiculus* e *P. sanguineus* permitem inferir uma boa atividade das enzimas em condições brandas, semelhantes às encontradas no ambiente, e mesmo que os ensaios realizados não

demonstrem a degradação dos herbicidas estudados pelas lacases, estas podem servir a propósitos de biorremediação de outros xenobióticos que sejam suscetíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, M. C, GUGLIOTTA A. M., DA SILVA, R., FUJIEDA, R. J.Y., BOSCOLO, M., GOMES, E. Ligninolytic activity from newly isolated basidiomycete strains and effect of these enzymes on the azo dye orange II decolourisation. **Annals of Microbiology**, v. 58, n.3, p. 427-432, 2008.

ABATE, G.; MASINI, J. C. Sorption of Atrazine, Propazine, Deethylatrazine, Deisopropylatrazine and Hydroxyatrazine onto Organovermiculite. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.5, p. 936-943, 2005.

AITKEN, M. D.; IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 276, n. 2, p. 405-414, 1990.

AMITAI, G.; ADANI, R.; SOD-MORIAH, G.; RABINOVITZ, I.; VINCZE, A.; LEADER, H.; CHEFETZ, B.; LEIBOVITZ-PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Oxidative degradation of phosphorothiolates by fungal laccase. **FEBS Letters**, v. 438, p. 195-200, 1998.

ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n.9, p. 3110-3116, 1992.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; 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**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 602-605, 2001.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 77. p. 89-91, 2001.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R.; WESLEY, A. **Microbial ecology: fundamentals and applications**, 4 ed., Menlo Park: Longman, 1997.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215-242, 2006.

BARID, C. **Química ambiental**. 2. ed., Porto Alegre, Bookman, 2002.

BEHKI, R.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1955-1959, 1993.

BENDING, G. D.; FRILOUX, M.; WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by

white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 59-63, 2002.

BERGER, B. M. Parameters influencing biotransformation rates of phenylurea herbicides by soil microorganisms. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.60, p. 71-82, 1998.

BERGER, B. M. Factors influencing transformation rates and formation of products of phenylurea herbicides in soil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 3389-3396, 1999.

BOGAN, B. W.; SCHOENIKE, B.; LAMAR, R. T.; CULLEN, D. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2381-2386, 1996.

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

BONONI, V. L. R. (org.). **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Secretaria do Estado de Meio Ambiente, 1998.

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**, v. 30, p. 418-426, 2001.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates – an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS**, v.267, n.1, p. 99-102, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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**, v. 3, p. 2604-2614, 2005.

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

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**, v. 128, p. 81-88, 1995.

BUSWELL, J. A.; MOLLET, B.; ODIER, E. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency. **FEMS Microbiology Letters**, v. 25, p. 295-299, 1984.

CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S. D. Enzimology of *Phanerochaete*

chryso sporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. Ed., London: Academic Press, 2001.

CASTILLO, M. P.; ANDERSSON, A.; ANDER, P.; STENSTRÖM, J.; TORTENSSON, L. Establishment of the white-rot fungus *Phanerochaete chryso sporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 17, p. 627-633, 2001.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 324-333, 1997.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of Microbiology**. v. 179, p. 145-150, 2003.

CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento, 2007. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2007/2008, primeiro levantamento maio de 2007**. Brasília: CONAB, 2007, 12p.

CULLINGTON, J. E.; WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 677-686, 1999.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.47, n.6; p. 999-1003, 2004.

DONNELLY, P. K.; ENTRY, J. A.; CRAWFORD, D. L. Degradation of atrazina and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n.8, p. 2642-2647, 1993.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environment**, v. 28, p. 83-90, 2000.

EERD, L. L. V.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganism. **Weed Sciences**, v. 51, p. 472-495, 2003.

ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (org.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, 510 p.

EVANS, C. S.; DUTTON, M. V.; GUILLÉN, F.; VENESS, R. G. Enzymes and small molecular agents involved with lignocelluloses degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 235-240, 1994.

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**, v. 12, n.1, p. 25-38, 2007.

FRATILA-PACHITEI, L. E.; HIRST, J. A.; SIEBEL, M. A.; GIJZEN, H. J. Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 147-154, 1999.

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**, v. 23, n.4, p. 504-511, 2000.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v. 56, p. 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**. V. 6, n. 1, p. 20-40, 2006.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra celular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 339-354, 2004.

GILL, P. K.; ARORA, D. S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white-rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Technology**, v. 30, p. 28-33, 2003.

GLENN, J. K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M. H. Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 251, n. 2, p. 688-696, 1986.

GOODDY, D. C.; CHILTON, P. J.; HARRISON, I. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. **The Science of Total Environment**, v. 27, p. 67-83, 2002.

GORBATOVA, O. N.; KOROLEVA, O. V.; LANDESMAN, E. O.; STEPANOVA, E. V.; ZHERDEV, A. V. Increase of detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 414-419, 2006.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase. **Proceedings of Japanese Academy**, v. 80, p. 204-214, 2004.

HIRATSUKA, N.; WARISHII, H.; TANAKA, H. Degradation of diphenyl-ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 563-571, 2001.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and lacases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering**, v.3, p. 1-19, 2004.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.2; p. 524-528, 2000.

KAAL, E. E. J.; FIELD, J. A.; JOYCE, T. W. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 133-139, 1995.

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**, v. 36, p. 4907-4915, 2002.

KANUNFRE, C. C.; ZANCAN, G. T. Physiology of exolaccase production by *Telephora terrestris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, p. 151-156, 1998.

KEARNEY, P. C.; PLIMMER, J. R. Metabolism of 3,4-dichloroaniline in soils. **Jornal of Agricultural Food Chemistry**, v. 20, n.3, p. 584-585, 1972.

KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. **Chemosphere**, v.56, p. 23-30, 2004.

KEYSER, P.; KIRK, T. K.; ZEIKUS, J. G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. **Journal of Bacteriology**, v. 135, n. 3, p. 790-797, 1978.

KHADRANI, A.; SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R.; VROUMSIA, T. Degradation of three phelyurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil. **Chemosphere**, v.38, p. 3041-3050, 1999.

KIISKINEN, L. L.; VIKARI, L.; KRUUS, K. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 198-204, 2002.

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**, v. 117, p. 277-285, 1978.

LANCHOTE, V. L.; BONATO, P. S.; CEDRDEIRA, A. L.; SANTOS, A. G.; CARVALHO, D.; GOMES, M. A. HPLC screening and GC-MS confirmation of triazine herbicides residues in drinking water from sugar cane area in Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 118, p. 329-337, 2000.

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, p.115-185, 1999.

LEVIN, L.; VIALE, A.; FORCHIASSIN, A. Degradation of organic pollutants by the white-rot basidiomycete *Trametes troguii*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, p. 1-5, 2003.

LITTHAUER, D.; VAN VUUREN, M. J.; VAN TONDER, A.; WOLFAARDT, F. W. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 563-568, 2007.

MACHADO, D. R. M.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 415-421, 2000.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1451-1457, 1995.

MASAPHY, S.; HENIS, Y.; KRINFELD, B.; LEVANON, D. In-vitro N-de-ethylation of atrazine by cell-free extract of *Pleurotus pulmonarius* is induced by Mn²⁺. **Biotechnology Letters**, v.19, n.9, p. 861-864, 1997.

MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HENIS, Y. Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 56, p. 207-214, 1996.

MASAPHY, S.; LEVANON, D.; VAYA, J.; HENIS, Y. Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(1-hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.12, p. 4342-4346, 1993.

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 415-421, 2000.

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

MESTER, T.; JONG, E.; FIELD, J. A. Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.5, p. 1881-1887, 1995.

MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 881-87, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 158-164, 2007.

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**. V. 21, p. 103-120, 2004.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v.1, p. 145-148, 2003.

MOUGIN, C.; KOLLMANN, A.; JOLIVALT, C. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. **Biotechnology Letters**, v.24, p. 139-142, 2002.

MOUGIN, C.; LAUGERO, C.; ASTHER, M.; CHAPLAIN, V. Biotransformation of s-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Pesticide Science**, v. 49, p. 169-177, 1997.

MOUGIN, C.; LAUGERO, C.; ASTHER, M.; DOBROCA, J.; FRASSE, P.; ASTHER, M. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.2, p. 705-708, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 ed. Sarvier, 2006.

NETO, S. L. M. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB 444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. Dissertação de mestrado, Instituto de Botânica e Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006, 110p.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1545-1551, 2004.

NYANHONGO, G. S.; GOMES, J.; GÜBITZ, G.; ZVAUYA, R.; READ, J. S.; STEINER, W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 259-263, 2002.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A.; SANNIA, G. A novel laccase from *Pleurotus ostreatus*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n.50, 1997.

PEDRA, W. N.; MARINO, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. Em serragem de casca de coco (*Cocos nucifera* LINN) suplementada com farelo de arroz e / ou trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 219-225, 2006.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; de La RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Introductory Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

POINTING, S. B.; VRJIMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 16, p. 317-318, 2000.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASIL'CHENKO, L. G. Fungal decomposition

of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.

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**, v. 239, p. 12564-12570, 1988.

RALEBITSO, T. K.; SENIOR, E.; VAN VERSEVELD, H. W. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. **Biodegradation**, v. 13, p. 11-19, 2002.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCOLCELOS, A. F.; HADDAD, R.; DEKKER, R. F. H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal liquid media containing the herbicide, Scepter. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 460-469, 2005.

RIGAS, F.; MARCHANT, R.; DRITSA, V.; KAPSANAKI-GOTSI, E.; GONOU-ZAGOU, Z.; AVRAMIDES, J. Screening of wood rotting fungi potentially useful for the degradation of organic pollutants. **Water, air and soil pollution: focus**, v 3, p. 201-210, 2003.

RITTMANN, B. E.; McCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. New York: McGraw-Hill, 2001.

RODRÍGUEZ, E.; NUERO, O.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A T.; MARTÍNEZ, M. J. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidases. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p. 909-916, 2004.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. **Scientia Agricola**, v. 54, n.4, p. 723-728, 2000.

SANTOS, S. X., CARVALHO, C. C., BONFÁ, M. R. L, SILVA, R., GOMES, E. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting Basidiomycetes and characterization of the enzymes. **Folia Microbiologica**, v.49, p.46 - 52, 2004.

SANTOS, S. X. **Diversidade, Isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores da madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista – São José do Rio Preto / Mirassol, SP**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; MAJCHERCZYK, A.; JOHANNES, C.; HÜTTERMANN, A. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 43, p. 93-100, 1999.

SEBAI, T. E.; LAGACHERIE, B.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. Isoation and characterization of an isoproturon-meneralizing *Methylophila* sp. TES from French agricultural soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 103-110, 2004.

SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Org.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412p., cap. 19, p. 349 –

379.

SØRENSEN, S. R.; BENDING, G. D.; JACOBSEN, C. S.; WALKER, A.; AAMAND, J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, p. 1-11, 2003.

SØRENSEN, S. R.; RONEN, Z.; AAMAND, J. Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5403-5409, 2001.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 391-396, 1999.

TEKERE, M.; ZVAUYA, R.; READ, J. S. Ligninolytic enzyme production in selected subtropical white rot fungi under different culture conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n.2, p. 115-129, 2001.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 238-249, 1988.

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

TRAVKIN, V.; BASKUNOV, B. P.; GOLOVLEV, E. L.; BOERSMA, M. G.; BOEREN, S.; VERVOORT, J.; VAN BERKEL, W. J. H.; RIETJENS, I. M. C. M.; GOLOVLEVA, L. A. Reductive deamination as a new step in the anaerobic microbial degradation of halogenated anilines. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 307-312, 2002.

TURNBULL, G. A.; OUSLEY, M.; WALKER, A.; SHAW, E.; MORGAN, J. A. W. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid associated hydrolase gene, *puhA*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 2270-2275, 2001.

VASIL'CHENKO, L. G.; KHROMONYGINA, V. V.; KOROLEVA, O. V.; LANDESMAN, E. O.; GAPONENKO, V. V.; KOVALEVA, T. A.; KOZLOV, Y. P.; RABINOVICH, M. L. Consumption of triazine herbicide atrazine by laccase-positive and laccase-negative strains of soil fungus *Mycelia sterilia* INBI 2-26. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, n.5, p. 454-459, 2002.

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

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 1996.

VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J. L.; KHADRANI, A. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron,

diuron and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. **Chemosphere**, v.33, n.10, p. 2045-2056, 1996.

WARISHII, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.33, p.23688-23695, 1992.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 1001-1013, 1995.

WILKINSON, V.; LUCAS, R. L. Effects of herbicides on the growth of soil fungi. **New Phytologist**, v. 68, p. 709-719, 1969.

YASSIR, A.; RIEU, C.; SOULAS, G. Microbial N-dealquilation of atrazine: effect of exogenous organic substrates and behaviour of the soil microflora. **Pesticide Science**, v. 54, p. 75-82, 1998.

YOUN, H.D.; HAH, Y. C.; KANG, S. O. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, p. 183-188, 1995.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A

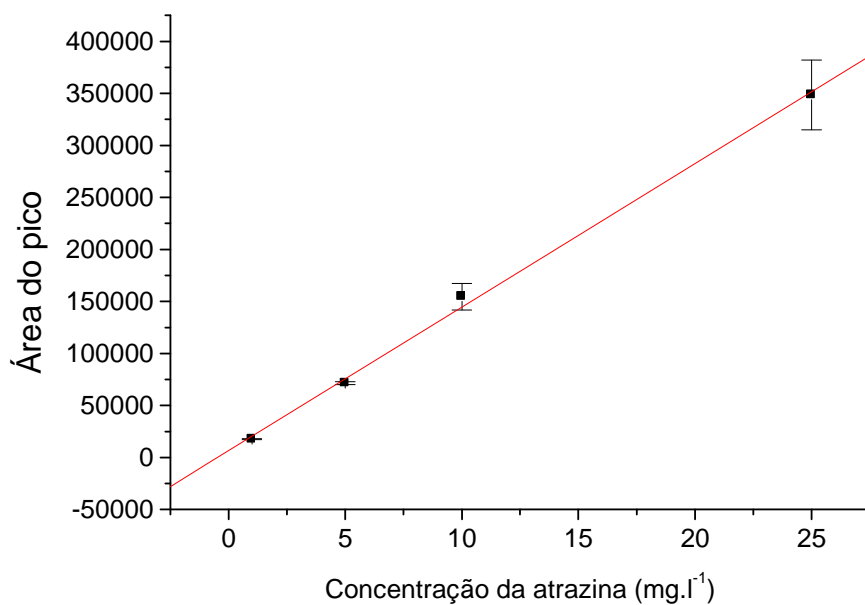
Curva de calibração para a atrazina, realizada em HPLC Jasco, usando coluna C18, e fase móvel composto por acetonitrila: água (55:54).

04/06/2008 16:37:40.000

Linear Regression for Datal_B:
 $Y = A + B * X$

Parameter	Value	Error
A	6573,72109	6241,1772
B	13797,02721	455,48758

R	SD	N	P
0,99891	8283,74015	4	0,00109



APÊNDICE B

Curva de calibração para o diurom, realizada em HPLC Jasco, usando coluna C18, e fase móvel composto por acetonitrila: água (60:40).

27/01/2008 19:15:42.000

Linear Regression for Datal_B:

$$Y = A + B * X$$

Weight given by Datal_C error bars.

Parameter	Value	Error
A	-260,08535	1123,22952
B	6113,28219	397,54407

R	SD	N	P
0,9958	0,59363	4	0,0042

