



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

RICARDO LUIS MORISUGI ARAKAKI

ESTUDO DO CRESCIMENTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIUROM PELO BASIDIOMICETO
Dacryopinax elegans SXS323 EM MEIO LÍQUIDO AGITADO COM BAIXA
ATIVIDADE DE ÁGUA

São José do Rio Preto - SP
Abril de 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

RICARDO LUIS MORISUGI ARAKAKI

ESTUDO DO CRESCIMENTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIUROM PELO BASIDIOMICETO
Dacryopinax elegans SXS323 EM MEIO LÍQUIDO AGITADO COM BAIXA
ATIVIDADE DE ÁGUA

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

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

São José do Rio Preto - SP
Abril de 2011

Arakaki, Ricardo Luis Morisugi.

Estudo do crescimento, atividade enzimática e degradação do herbicida diuron pelo basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 em meio líquido agitado com baixa atividade de água / Ricardo Luis Morisugi Arakaki. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

104 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes

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

1. Enzimologia. 2. Fungos. 3. Biorremediação. 4. Basidiomicetos. 5. Diuron. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.15

RICARDO LUIS MORISUGI ARAKAKI

ESTUDO DO CRESCIMENTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIUROM PELO BASIDIOMICETO
Dacryopinax elegans SXS323 EM MEIO LÍQUIDO AGITADO COM BAIXA
ATIVIDADE DE ÁGUA

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Mirna Helena Regali Seleglim
Professor Adjunto III
UFSCar – São Carlos

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

São José do Rio Preto, 25 de abril de 2011

Dedico esse trabalho aos meus mais
preciosos tesouros: minha mãe, Fújie;
meus irmãos Marcela, Maurício e
Rafael; e meu sobrinho, o pequeno Gui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda a luz, paz e segurança nos momentos em que precisei.

Agradeço à minha família, meu porto seguro, e aos meus padrinhos Maria e Miyoshi e suas respectivas famílias por todo o apoio, incentivo e carinho demonstrados ao longo de todos esses anos.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes pela sua confiança, orientação e dividir um pouco de seu grande conhecimento comigo.

Agradeço a todos os colegas do laboratório: Aline, Carol Merheb, Carol Bezerra, Nati, Dani, Rodrigo, Rafa, Fabi, Marcia, Ticiane, Thiago Ohe, Janaína, Rodolfo e todos os outros guerreiros por toda colaboração.

Aos amigos conquistados nessa jornada de laboratório: Ariane, Lari, Gi, Bah, Ana Lúcia, Tássia, Andréia, Thiago, Isabel. Muito obrigado pelos momentos de conforto.

Às amigas Luciana, Andréa, Jacqueline, Maria Ana Paula, Camila, Pati, Livia e a minha querida prima Andréa por todos os bons momentos que passamos e passaremos juntos.

À equipe SPM: Arlindo, Alexandra, Jacqueline, Maria Luiza, Juliana, Pedro, Ana Caroline, Danielle, Juliana Adriano, Gustavo, Sandra, Leonardo Centanini, Daniel, Leonardo, Ricardo Rockko, Murillo, Nathany, Bruna, Osvando, Guilherme pela colaboração nesses momentos finais

Agradeço aos Profs. Drs. Roberto da Silva e Maurício Boscolo por todo o auxílio prestado.

Agradeço à CNPq pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Fungos.....	16
2.2	Lignina	18
2.3	Enzimas Ligninolíticas.....	21
2.3.1	Lacase	21
2.3.2	Lignina Peroxidase (LiP).....	24
2.3.3	Manganês Peroxidase (MnP).....	25
2.3.4	Fatores que interferem a atividade das ligninases	26
2.4	Aplicações dos basidiomicetos e suas ligninases em biorremediação	27
2.5	Fungos Halotolerantes	29
2.6	Solutos Compatíveis	31
2.7	Degradação de Diurom	33
2.8	Justificativa	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	MICROORGANISMOS	37
4.2	MEIOS DE CULTURA E TAMPÃO DE KNAPP	38
4.3	PREPARO DO PRÉ-INÓCULO	38
4.4	CULTIVO DOS FUNGOS	39
4.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EXTRACELULAR E AFERIÇÃO DA BIOMASSA.....	39
4.6	CONDIÇÃO DE BAIXA ATIVIDADE DE ÁGUA.....	40
4.7	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DE LIGNINASES DE <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323.....	40
4.7.1	Lacase	40
4.7.2	Manganês peroxidase (MnP)	41
4.7.3	Lignina peroxidase (LiP)	41
4.8	CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	42
4.9	PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA CONTENDO DIUROM.....	42
4.10	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS FUNGOS DE DEGRADAR DIUROM	43
4.11	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE COMPOSTOS REDUTORES	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Crescimento micelial em meio contendo NaCl 0,5 M.....	45
5.2	Crescimento micelial em meio líquido levemente agitado contendo 0,6 M ou 0,8 M de NaCl	56
5.3	Crescimento micelial de <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323 em diferentes condições de cultivo	64
5.4	CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES	69
5.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	73
5.5.1	Lacase	73
5.5.2	Manganês Peroxidase	75
5.5.3	Lignina Peroxidase	77

5.6	DEGRADAÇÃO DE DIUROM.....	78
6	DISCUSSÃO.....	82
7	CONCLUSÕES.....	86
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
	APÊNDICE.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da lignina, mostrando a ligação éter β -O-4 (adaptado de ANKE; WEBER, 2006).....	18
Figura 2: Os fenilpropanóides constituintes da lignina. a) Álcool <i>p</i> -cumarílico, b) álcool coniferílico e c) álcool sinapílico. No álcool sinapílico é mostrado a designação de cada um dos átomos de carbono que compõem esses monômeros (Adaptado de ONNERUD et al., 2002).....	19
Figura 3: Estrutura tridimensional da lacase de <i>Corpinus cinereus</i> , com extremidade N-terminal (azul) a C-terminal (vermelho). Os átomos de cobre são mostrados como esferas, com os sítios T1 em azul e o par T3 em amarelo. (MOREIRA NETO, 2006, apud DUCROS et al., 2001).....	22
Figura 4: Ciclo catalítico da lacase (adaptado de SOLOMON et al., 1996).....	23
Figura 5: Reações catalíticas da lacase acopladas aos mediadores metabólicos, atuando na oxidação do substrato e na redução do oxigênio molecular à água (adaptado de BRANCHI et. al., 2005).....	24
Figura 6: Ciclo catalítico da Lignina peroxidase (MOREIRA NETO, 2006).....	25
Figura 7: Ciclo catalítico da Manganês peroxidase (retirado de HOFRICHTER, 2002).....	26
Figura 8: Exemplos de compostos que atuam como solutos compatíveis (GRANT, 2004)....	32
Figura 9: Fórmula estrutural do diurom.....	34
Figura 10: Fluxograma das atividades executadas.....	37
Figura 11: Curva de crescimento da linhagem <i>Datronia caperata</i> MCA5, um dos fungos que apresentaram forte inibição do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	47
Figura 12: Curva de crescimento da linhagem <i>Gloeophyllum striatum</i> MCA7, apresentando forte inibição em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	48
Figura 13: Curva de crescimento da linhagem <i>Gloeophyllum striatum</i> MCA2, que apresentou forte inibição em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	49
Figura 14: Curva de crescimento da linhagem <i>Hexagonia hirta</i> MCA131, que apresentou forte inibição em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	50
Figura 15: Curva de crescimento da linhagem <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA16, que apresentou inibição intermediária em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	51
Figura 16: Curva de crescimento da linhagem <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA9, que apresentou inibição intermediária em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	52
Figura 17: Curva de crescimento da linhagem <i>Polyporus tenuiculus</i> MCA11, que apresentou inibição intermediária em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	53
Figura 18: Curva de crescimento da linhagem <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	54
Figura 19: Curva de crescimento da linhagem <i>Polyporus sp</i> MCA128, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	55

Figura 20: Curva de crescimento da linhagem <i>Datronia stereoides</i> MCA167, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.....	56
Figura 21: Curva de crescimento da linhagem <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.....	58
Figura 22: Curva de crescimento da linhagem <i>Datronia stereoides</i> MCA167, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.....	59
Figura 23: Curva de crescimento da linhagem <i>Polyporus sp</i> MCA128, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.....	61
Figura 24: Curva de crescimento da linhagem <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA16, que apresentou inibição intermediária em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.....	62
Figura 25: Curva de crescimento da linhagem <i>Gloeophyllum striatum</i> MCA2, que apresentou forte inibição em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.....	64
Figura 26: Biomassa micelial. A) Curvas de crescimento de <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com glicose 5,0 g . L ⁻¹ , acrescido ou não de cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M. B) Curvas de crescimento de <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M.....	68
Figura 27: Curvas de consumo de compostos redutores em meio com glicose podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol.....	69
Figura 28: Curvas de crescimento e de consumo de compostos redutores em meio contendo glicose.....	70
Figura 29: Curva de crescimento e de consumo de compostos redutores em meio contendo glicose e cloreto de sódio.....	71
Figura 30: Curva de crescimento e de consumo de composto redutor do fungo <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323 em meio contendo glicose e manitol.....	72
Figura 31: Curva de crescimento e curva de consumo de composto redutor do basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com glicose e glicerol.....	73
Figura 32: Curva de consumo de diurom pelo basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 nas condições controle, cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M e glicerol 0,5 M.....	79
Figura 33: Curva de degradação físico-química de diurom. É possível perceber a estabilidade da curva, indicando que não há degradação espontânea do herbicida.....	80
Figura 34 – Cromatogramas dos padrões de diurom, nas concentrações de 1,0 mg . L ⁻¹ (A) e 5,0 mg . L ⁻¹ (B), analisadas em HPLC. Detector a 240 nm.....	95
Figura 35 – Cromatogramas dos padrões de diurom, nas concentrações de 10,0 mg . L ⁻¹ (A) e 20,0 mg . L ⁻¹ (B), analisadas em HPLC. Detector a 240 nm.....	96
Figura 36 – Cromatogramas do meio adicionado diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	97
Figura 37 – Cromatogramas do meio sem adição de diurom, com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	98
Figura 38 – Cromatogramas do meio com adição de cloreto de sódio 0,5M e diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	99
Figura 39 – Cromatogramas do meio com adição de cloreto de sódio 0,5M, com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	100

Figura 40 – Cromatogramas do meio com adição de manitol 0,5M e diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	101
Figura 41 – Cromatogramas do meio com adição de manitol 0,5M, com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	102
Figura 42 – Cromatogramas do meio com adição de glicerol 0,5M e diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	103
Figura 43 – Cromatogramas do meio com glicerol 0,5M, com 240 horas de fermentação. A) Meio não inoculado. B) Meio inoculado. Detector a 240 nm.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de micro-organismos decompositores da madeira (retirada de MOREIRA NETO, 2006, apud TUOMELA et al., 2000.....	21
Tabela 2: Agrupamento das linhagens fúngicas de acordo com o seu comportamento de crescimento micelial em meio líquido contendo NaCl 0,5M, apresentado no tempo de 240 horas. Valores médios±desvio padrão.....	46
Tabela 3: Biomassa média do fungo <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3.....	57
Tabela 4: Biomassa média do fungo <i>Datronia stereoides</i> MCA167 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3.....	59
Tabela 5: Biomassa média do fungo <i>Polyporus sp</i> MCA128 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3.....	60
Tabela 6: Biomassa média do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA16 produzida em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3.....	62
Tabela 7: Biomassa média do fungo <i>Gloeophyllum striatum</i> MCA2 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3.....	63
Tabela 8: Produção média de biomassa do basidiomiceto <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323 em meio com glicose 5,0 g . L ⁻¹ como fonte de carbono e cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M, mostrando se houve estímulo (+) ou inibição(-) do crescimento. (média±desvio padrão). N=2.....	65
Tabela 9: Biomassa média do basidiomiceto <i>Dacryopinax elegans</i> SXS323 em meio com diurom 10 mg . L ⁻¹ e com cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M, mostrando o estímulo (+) ou inibição do crescimento (-) nos tratamentos estudados. (média±desvio padrão). n=2.....	66
Tabela 10: Estímulo (+) ou inibição (-) do crescimento micelial em presença de diurom, considerando a produção de biomassa em meio com glicose como referência.....	67
Tabela 11: Atividade de lacase em meio com glicose 5,0 g . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (Média±Desvio Padrão), n=2.....	74
Tabela 12: Atividade de lacase do basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão) , n=2.....	75
Tabela 13: Atividade de manganês peroxidase do basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com glicose 5,0 g . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2.....	76
Tabela 14: Atividade de manganês peroxidase do basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2.....	76
Tabela 15: Atividade de lignina peroxidase do basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com diurom 5,0 g . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2.....	77
Tabela 16: Atividade de lignina peroxidase do basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L ⁻¹ , podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2.....	78
Tabela 17: Taxa de degradação do herbicida diurom pelo basidiomiceto <i>D. elegans</i> SXS323 nos diferentes tratamentos estudados: controle, cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M e glicerol 0,5 M.....	79

RESUMO: Os basidiomicetos são conhecidos por sua capacidade em degradar a madeira. Essa característica deve-se à sua habilidade em oxidar a lignina presente nas plantas. Essa molécula é um composto recalcitrante formado por sub-unidades de fenilpropanóides e as enzimas capazes de degradá-la são conhecidas conjuntamente como enzimas ligninolíticas. Tais enzimas são inespecíficas. Essa característica confere-lhes o seu emprego na oxidação de compostos que possuem estrutura molecular semelhante à da lignina, tais como pesticidas e hidrocarbonetos poli-aromáticos, que possuem anéis aromáticos em sua estrutura. Dessa forma, é possível utilizar tais enzimas na degradação desses xenobióticos. Alguns basidiomicetos possuem a habilidade de crescer em meio com baixa atividade de água. Assim, é possível usá-los em processos de biorremediação de ambientes que possuem uma alta concentração de solutos, como em meios com alta salinidade. Esse trabalho teve como objetivo o estudo da capacidade de crescimento em meio líquido agitado com baixa atividade de água do basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323, promovida pela adição de cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M ao meio de cultura; a produção de enzimas ligninolíticas e o seu poder de degradação do herbicida diurom nessas condições. Verificou-se que o basidiomiceto foi capaz de crescer sob todos os meios testados, sendo este mais pronunciado quando manitol ou glicerol foram acrescentados ao meio, averiguando-se um estímulo de crescimento. O manitol e o glicerol serviram como fonte secundária de carbono. O cloreto de sódio inibiu seu crescimento. Outro fator de inibição do crescimento foi a adição de diurom. A produção de enzimas ligninolíticas foi muito baixa, com pico de atividade de $3,67 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ com 144 horas de cultivo em meio com glicerol 0,5M. Apesar disso, detectou-se degradação do herbicida, registrando-se redução nas concentrações iniciais de 32,63% (glicerol 0,5M, 192 horas), 25,47% (manitol 0,5M, 192 horas), 20,51% em meio com glicose $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (240 horas) e 11,48% (NaCl 0,5M, 240 horas). Desse modo, embora *D. elegans* SXS323 consiga crescer em meio com diurom como única fonte de carbono, não foi possível correlacionar tal fato com a produção de ligninases.

Palavras-chaves: Biorremediação, Basidiomiceto, Diurom, Ligninases, Atividade de água.

ABSTRACT: The basidiomycetes are known for their ability to degrade wood. This feature is due to its ability to oxidize lignin of plants. This molecule is a compound formed by recalcitrant sub-units of phenylpropanoids and enzymes able to degrade it and are known as ligninolytic enzymes. These enzymes are nonspecific. This characteristic provides them the capability of oxidation of compounds that have molecular structures similar to lignin, such as pesticides and polyaromatic hydrocarbons, which possess aromatic rings in their structure. Thus, it is possible to use such enzymes in the degradation of xenobiotics. Some basidiomycetes have their ability to grow in media with low water activity. Thus, it can be used in bioremediation process in environments that have a high concentration of solutes, such as hypersaline environments. This work aimed to study the capability of the basidiomycete *Dacryopinax elegans* SXS323 to grow in liquid shaken with low water activity, promoted by the addition of sodium chloride 0.5 M, mannitol 0.5 M or glycerol 0.5 M to the medium culture, the production of ligninolytic enzymes and their degradation capability of the herbicide diuron in these conditions. It was found that the basidiomycete was able to grow in all media tested. The growth was most pronounced when mannitol or glycerol was added to the medium, probably working as a stimulus for growth, and were used as a secondary source of carbon. Sodium chloride inhibited its growth. Another factor inhibiting the growth was the addition of diuron. The ligninolytic enzyme production was very low, with peak activity of 3.67 U. L⁻¹ with 144 hours in medium with glycerol 0.5 M. Nevertheless, we detected the degradation of the herbicide, registering 32.63% (glycerol 0.5 M, 192 hours), 25.47% (mannitol 0.5 M, 192 hours) 20.51% of reduction in medium with glucose 5.0 g . L⁻¹ (240 hours) and 11.48% (NaCl 0.5 M, 240 hours). Thus, although *D. elegans* SXS323 can grow in medium with diuron as sole carbon source, it was not possible to correlate this fact with the production of ligninases.

Key words: Bioremediation, basidiomycetes, diuron, ligninases, low water activity

1 INTRODUÇÃO

Os basidiomicetos são conhecidos pela sua capacidade de degradar a madeira em seu habitat natural. Essa propriedade está relacionada com sua habilidade em mineralizar a lignina, um polímero recalcitrante presente na parede celular dos vegetais (HOFRICHTER, 2002). A degradação de lignina é promovida por enzimas oxidativas e inespecíficas, capazes de decompor compostos aromáticos. Essa característica faz com que essas enzimas possam agir sobre substâncias que tenham estrutura parecida com a da lignina (TOMAZ, 2003). Tal semelhança é averiguada em vários poluentes como efluentes de indústrias têxteis, hidrocarbonetos policíclicos, alguns tipos de pesticidas e efluentes das indústrias em geral. Esses compostos, também chamados de xenobióticos, são de difícil biodegradação e podem ser danosos à biota. Deste modo, eles não podem ser descartados sem que se faça o seu tratamento, diminuindo assim o impacto causado ao ambiente (KOKOL et al., 2007). As ligninases são uma alternativa de tratamento. Elas também são utilizadas no processo de fabricação do papel, tanto no seu branqueamento como no empolpamento da celulose (LI, et al., 2003a).

O tratamento desses compostos recalcitrantes por métodos físico-químicos é caro e tem alto gasto energético. Muitas vezes, podem ser gerados compostos mais tóxicos do que os compostos originais. Os estudos na área da Enzimologia vêm mostrando que o tratamento biológico, por meio da utilização de enzimas, como as ligninases são mais eficientes e apresentam um custo mais baixo, pois elas funcionam como catalisadores e podem ser recuperadas ao final do processo. Além disso, a facilidade e simplicidade de controle do processo e o fato delas serem um material biológico e assim, não tóxico, são propriedades muito importantes do emprego das enzimas nestes processos (NAGARATHNAMMA et al., 1999).

Por isso, as enzimas ligninolíticas dos basidiomicetos são de fundamental importância para a eficiente bioconversão dos restos vegetais e são promissores em várias aplicações biotecnológicas, tais como polpa e papel, alimentos, indústria têxtil e de corantes, biorremediação, cosméticos, bioquímica analítica e muitas outras (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

Na agricultura, o uso de pesticidas é cada vez mais recorrente como forma de controle de pragas e para aumento da eficiência das lavouras. Contudo, os pesticidas, dentre eles os herbicidas, são persistentes no ambiente possuindo alta mobilidade e capacidade de bioacumular nos tecidos animais e assim provocar sérias alterações. A remoção desses compostos do ambiente de modo ecologicamente responsável, seguro e com uma relação custo-benefício favorável é uma grande preocupação das agências de manejo de solos. Um modo interessante de se conseguir isso é empregando-se micro-organismos nos processos de biorremediação. Desse modo, a capacidade dos fungos da podridão branca em degradar vários poluentes xenobióticos e recalcitrantes tem gerado considerável interesse para as pesquisas nas áreas de Microbiologia Industrial e Ambiental (COELHO et al., 2010).

Organismos halotolerantes têm uma grande aplicação biotecnológica, considerando que em muitos casos, as altas osmolaridade dos meios, como água de oceanos, estuários e vários tipos de resíduos industriais, impedem o tratamento biológico para a remoção de compostos xenobióticos. Alguns estudos tentam aplicá-los no tratamento de efluentes com alta osmolaridade, em que o emprego de micro-organismos sem essa propriedade seria ineficaz (LEITÃO et al., 2007). Desse modo, a seleção de linhagens microbianas halotolerantes e/ou suas enzimas pode oferecer ferramentas adicionais em processos de biorremediação.

Isto posto, a conscientização da importância de se preservar o meio ambiente e de que os recursos naturais são bens finitos têm contribuído bastante para o investimento em

pesquisa e desenvolvimento de tecnologias que agredam menos a natureza. Tendo em vista essa questão, o presente trabalho analisou a capacidade de crescimento de algumas linhagens de basidiomicetos em meio líquido agitado sob condições de estresse osmótico. Além disso, foi analisada a produção de enzimas ligninolíticas e a capacidade de degradação do herbicida diurom por *Dacryopinax elegans* SXS323 nessas condições.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos

A maioria dos fungos é aeróbio e multicelular, com células alongadas (hifas) que formam redes de filamentos denominadas micélio. Contudo, há algumas espécies que se desenvolvem como organismos unicelulares, sendo conhecidos genericamente como leveduras. Os fungos são organismos quimiorganotróficos, ou seja, obtêm sua energia oxidando compostos orgânicos. Eles liberam enzimas no meio extracelular que despolimerizam, por exemplo, as macromoléculas oriundas da parede celular vegetal como celulose, hemicelulose e lignina, permitindo que seus monômeros sejam incorporados pelas hifas por mecanismos de absorção. Essa modalidade de obtenção de nutrientes também é conhecida por saprofitismo (RAVEN et al., 2007; MOORE-LANDECKER, 1996; MADIGAN et al., 2010). São conhecidas aproximadamente 100.000 espécies de fungos e estima-se que haja um total de 1,5 milhões de espécies (MADIGAN et al., 2010).

O crescimento dos fungos é dependente de vários fatores, como temperatura, pH e fontes de carbono e nitrogênio. Muitos fungos são mesofílicos, crescendo em temperaturas que vão de 5° C a 37° C, mas com um ótimo variando entre 25° C e 30° C. A maioria dos fungos basidiomicetos cresce preferencialmente em ambientes acidificados, não se desenvolvendo bem em pH superiores a 7,5. As espécies do gênero *Coprinus* constituem uma exceção, pois se adaptam melhor a ambientes mais alcalinos (TUOMELA et al., 2000).

Os habitats dos fungos são diversos, podendo ocupar tanto ambientes aquáticos como terrestres, que constituem a maioria. Suas funções ecológicas também são diversas. Algumas espécies podem ser parasitas de plantas e animais, causando-lhes doenças severas. Outras formam associações simbióticas com plantas (micorrizas) ou algas e cianobactérias

(líquens). Contudo, o principal papel ecológico dos fungos é a decomposição da matéria orgânica, proporcionando a reciclagem de nutrientes (MADIGAN et al., 2010).

Os fungos constituem um grupo filogeneticamente distinto dos outros organismos vivos, assemelhando-se fisiologicamente mais aos animais (MADIGAN et al., 2010). Sua classificação tradicional baseia-se em dados citológicos e morfológicos, como o ciclo de vida e características estruturais dos gametas, gametângio, esporocarpo e esporos. Dados bioquímicos, genéticos e moleculares também são utilizados nessa tarefa (MOORE-LANDECKER, 1996). As filogenias baseadas em dados moleculares vêm crescendo muito, de modo que, levando em consideração esse tipo de dado, Hibbett e outros (2007), agruparam os fungos dentro do reino Fungi englobando um sub-reino (Dikarya), sete filos (Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladosmycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota), dez sub-filos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens. Essa classificação leva em consideração apenas espécies que monofileticamente pertençam ao reino Fungi. Ela exclui organismos que já não são mais considerados como membros desse reino, como os oomicetos e os fungos limosos.

O filo Basidiomycota caracteriza-se pela presença de ansas e de esporos haplóides (basidiósporos) em estruturas denominadas basídios. Cogumelos, orelhas-de-pau, gasteromicetos, ferrugens e carvões são alguns dos representantes desse filo (RAVEN et al., 2007). Em algumas espécies, o basidiósporo é lançado ativamente do basídio (CARLILE et al., 2002). O micélio apresenta hifas septadas e seus septos possuem um orifício central. Em algumas espécies, esse poro pode ter a margem inflada ou em forma de barril e é denominado doliporo (RAVEN et al., 2007).

O grupo possui mais de 22.000 espécies que vivem principalmente em solo ou sobre a madeira, cuja degradação é uma propriedade importante desses fungos, os quais

podem ser denominados de fungos de decomposição branca ou marrom em função dos níveis de degradação da lignina e celulose.

2.2 Lignina

A lignina (Fig. 1) é um dos polímeros mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose, constituindo-se de um polímero fenilpropanóide amorfo composto por unidades de álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fig. 2), interconectadas por ligações C—C e C—O—C estáveis (BOURBONNAIS; PAICE, 1988; HIGUCHI, 2004).

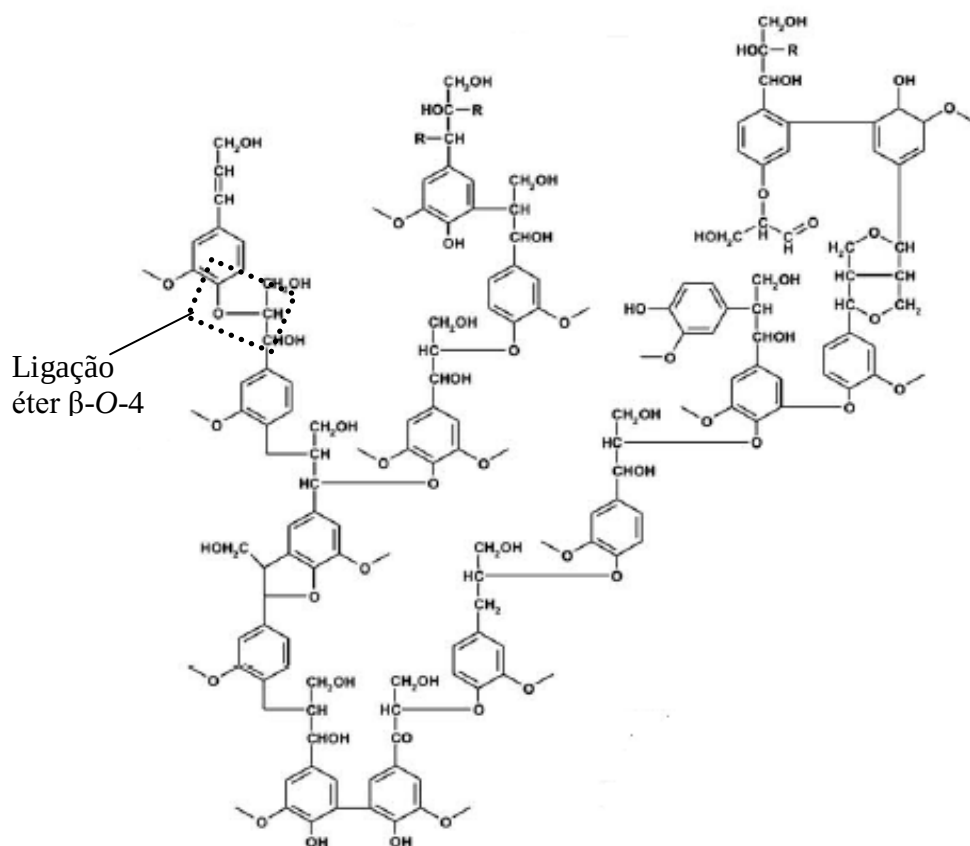


Figura 1: Estrutura da lignina, mostrando a ligação éter β -O-4 (adaptado de ANKE; WEBER, 2006).

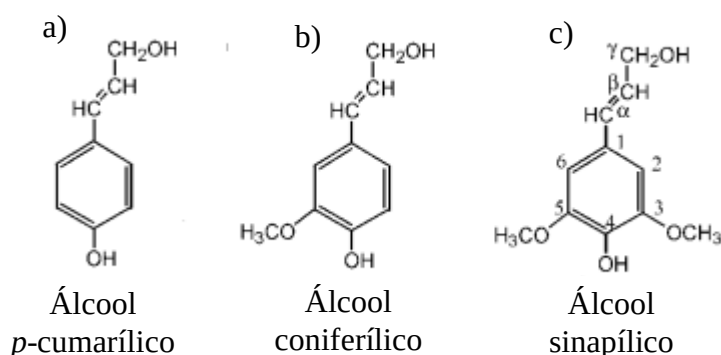


Figura 2: Os fenilpropanóides constituintes da lignina. a) Álcool *p*-cumarílico, b) álcool coniferílico e c) álcool sinapílico. No álcool sinapílico é mostrado a designação de cada um dos átomos de carbono que compõem esses monômeros (Adaptado de ÖNNERUD et al., 2002).

As funções biológicas da lignina são: a) dar rigidez e força à parede celular secundária das plantas vasculares; b) conferir hidrofobicidade à parede celular, o que permite maior eficiência no transporte de água pelos tecidos vasculares das plantas; e, c) dificultar o ataque microbiano aos tecidos do vegetal, pois a lignina torna-os tão compacto que impossibilita a penetração de macromoléculas como proteínas (ou enzimas hidrolíticas) nos tecidos (ÖNNERUD et al., 2002).

Esse polímero é de difícil degradação porque o mecanismo de ligação de radicais livres responsável pela sua biossíntese a partir do álcool cumarílico resulta num polímero interconectado por várias ligações C—C e éter que não são hidrolisáveis sob condições biológicas. A estrutura predominante, perfazendo quase metade do seu total, são as de éter com ligação β -O-4 (Fig. 1). Já foi claramente demonstrado que a lignina é racêmica e, consequentemente, mesmo um simples dímero com ligação β -O-4, com dois carbonos assimétricos, possui quatro estereoisômeros. Como o número de isômeros aumenta geometricamente com o número de sub-unidades, a lignina forma uma estrutura bem complexa e sem unidades repetitivas (HAMMEL; CULLEN, 2008).

A degradação da lignina é promovida principalmente por fungos da podridão branca. Eles são representados, principalmente, por basidiomicetos e alguns ascomicetos. Os basidiomicetos são responsáveis pela degradação tanto da madeira dura como da madeira mole. Mas, os ascomicetos, provavelmente, só conseguem decompor a madeira dura (KIRK; FARRELL, 1987). Os basidiomicetos são os organismos mais eficientes na mineralização da lignina, contudo, além desse polímero, os fungos da podridão branca também necessitam da celulose e da hemicelulose. A atividade ligninolítica está associada ao metabolismo secundário e é uma resposta fisiológica do fungo ao esgotamento de carbono e nitrogênio do substrato (TUOMELA et al., 2000).

Os fungos da podridão branca promovem a decomposição da lignina de modo seletivo ou não seletivo. Quando a deslignificação da madeira ocorre seletivamente, a lignina é removida sem que haja uma remoção significativa de celulose e hemicelulose (BLANCHETTE, 1995). Na degradação não seletiva da lignina, a maioria dos componentes da parede celular do vegetal é decomposta (TUOMELA et al., 2000).

Os fungos da podridão parda têm baixa capacidade de decompor a lignina. Eles degradam, principalmente a celulose e a hemicelulose, colonizando preferencialmente a madeira mole e apenas 6% de seus representantes são basidiomicetos. Esses fungos são capazes de modificar quimicamente a lignina, promovendo a desmetilação de suas unidades fenólicas e não fenólicas (KIRK; FARRELL, 1987); possuem limitada capacidade de hidroxilação e abertura dos anéis aromáticos; e mineralização de grupos metoxil (TUOMELA et al., 2000).

Os fungos da podridão mole são representados pelos ascomicetos e pelos fungos imperfeitos, possuindo a habilidade de degradar a madeira dura e a madeira mole, mas a madeira mole é decomposta mais extensivamente. Eles conseguem quebrar todos os componentes da madeira, entretanto, esse processo é muito lento, quando comparado aos

fungos da podridão branca e parda. Esses fungos também atuam sobre a serrapilheira e em ambientes muito severos para a adaptação dos outros tipos de fungos da podridão da madeira (TUOMELA et al., 2000).

Tabela 1 – Tipos de micro-organismo decompositores da madeira (retirada de MOREIRA NETO, 2006, apud TUOMELA et al., 2000)

Organismo	Filo	Degradação da lignina	Ambiente	Alguns gêneros
Fungos da podridão branca	Basidiomycota (Ascomycota)	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva	Principalmente madeira dura	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i> <i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungos da podridão parda	Basidiomycota	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Chaetomium</i> ,
Fungos da podridão mole	Ascomycota ou fungos anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serapilheira	<i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>
Bactérias	Actinomycetes ou Mixobactéria	Limitada degradação da lignina	Sapwood, madeira saturada de água, madeira em estágio avançado de decomposição, serapilheira	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

2.3 Enzimas Ligninolíticas

As enzimas que degradam a lignina são do tipo oxidorreduções e compõem um complexo enzimático, cujas principais enzimas são descritas a seguir.

2.3.1 Lacase

A lacase (E.C. 1.10.3.2) é uma proteína multicobre pertencente à família das enzimas oxidases azuis (fig. 3). Essa enzima, normalmente, contém quatro íons cobre,

agrupados em três grupos: T1, formado por um íon Cu^{2+} e é encarregado da oxidação do substrato reduzido e pela transferência de elétrons para os outros grupos; T2, também é formado por um íon Cu^{2+} e juntamente com o grupo T3, que contém dois íons Cu^{2+} , constituem o centro trinuclear de cobre, envolvido na redução do oxigênio e liberação de água (TORRES et al., 2003). A lacase é classificada como fenol oxidase e catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos (particularmente fenóis) e inorgânicos, com concomitante redução de oxigênio a água. Entre os substratos oxidados por essa enzima encontram-se: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, alguns difenilmetanos e benzopirenos (DURÁN; ESPOSITO, 2000). A lacase pode degradar lignina mesmo na ausência de outras ligninases, como a manganês peroxidase e a lignina peroxidase (MAYER; STAPLES, 2002).



Figura 3: Estrutura tridimensional da lacase de *Corpinus cinereus*, com extremidade N-terminal (azul) a C-terminal (vermelho). Os átomos de cobre são mostrados como esferas, com os sítios T1 em azul e o par T3 em amarelo. (MOREIRA NETO, 2006, apud DUCROS et al., 2001)

A principal interrogação em relação ao ciclo catalítico da lacase é o mecanismo pelo qual o centro trinuclear é reduzido. Partindo-se do estado nativo da enzima, uma molécula de substrato reduz o sítio T1 (fig. 4). A partir desse ponto, dois caminhos diferentes

podem ser seguidos. a) O sítio T1 transfere seu elétron para o sítio T2. Em seguida, uma outra molécula de substrato reduz o sítio T1 novamente. Os sítios T1 e T2 transferem seus elétrons para T3. T1 recebe um novo elétron do substrato que é transferido de novo para T2. Esse processo reoxida o sítio T1 que é novamente reduzido por um quarto substrato, resultando num estado totalmente reduzido da enzima, ou seja, seus quatro íons cobre estão com um elétron proveniente do substrato. b) O centro trinuclear é sequencialmente reduzido durante três passos de transferência de elétrons a partir do sítio T1, que é sequencialmente reduzido por uma molécula de substrato, resultando no mesmo estado reduzido da enzima (TORRES et al., 2003).

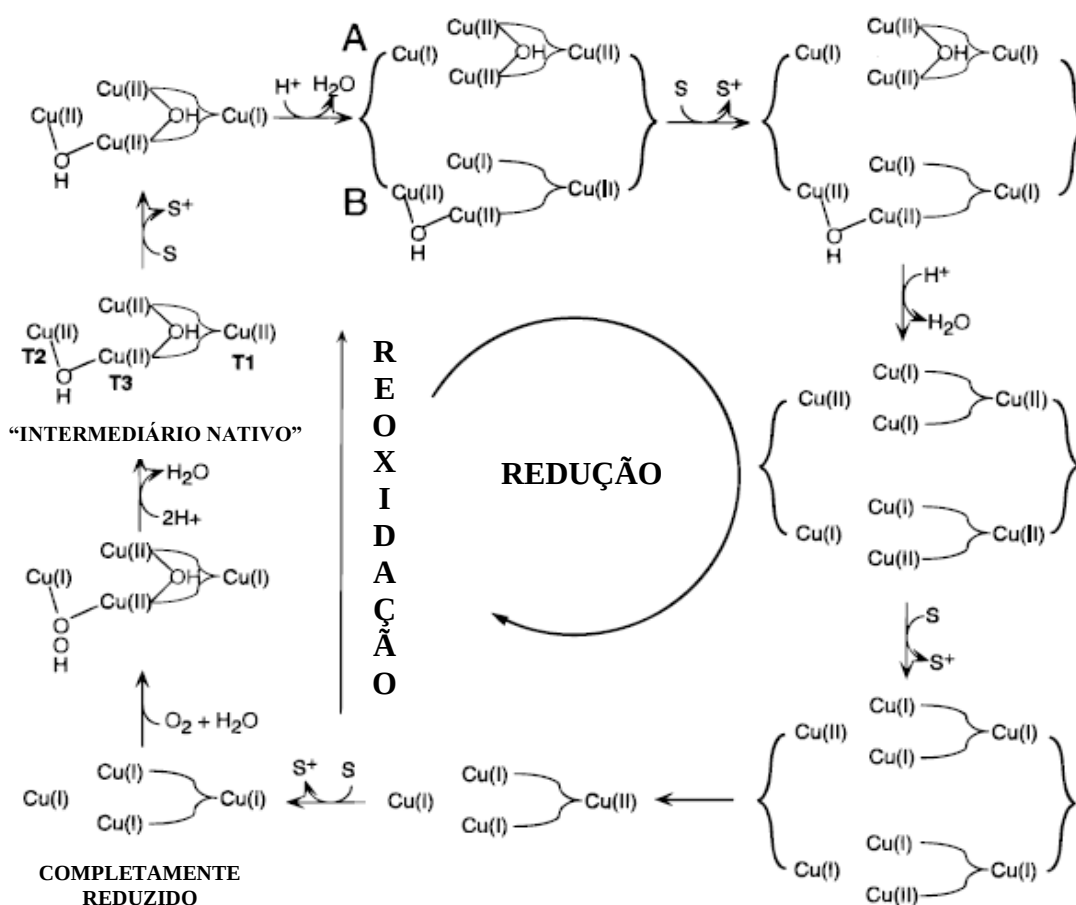


Figura 4: Ciclo catalítico da lacase (adaptado de SOLOMON et al., 1996).

O tipo de substrato oxidado por lacases pode ser ampliado por meio de um mecanismo de reação envolvendo mediadores redox, que são facilmente oxidados por lacases (no sítio T1) produzindo, em alguns casos, radicais catiônicos reativos e muito instáveis que podem oxidar substratos complexos antes de voltarem a seu estado original. Nesse mecanismo lacase-mediador, os mediadores oxidam substratos de alta massa molecular. Os elétrons transferidos para a lacase são passados para os mediadores, reduzindo oxigênio para a formação de água (fig. 5) (TORRE et al., 2003; MOREIRA NETO, 2006).

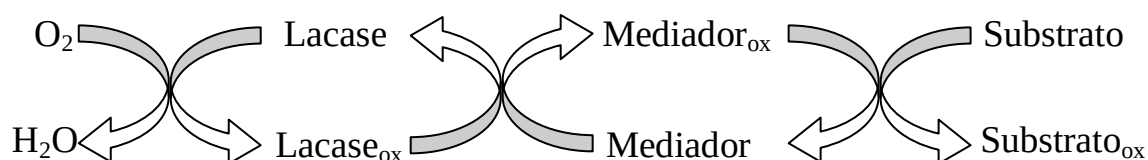


Figura 5: Reações catalíticas da lacase acopladas aos mediadores metabólicos, atuando na oxidação do substrato e na redução do oxigênio molecular à água (adaptado de BRANCHI et. al., 2005).

2.3.2 Lignina Peroxidase (LiP)

A lignina peroxidase (LiP, E. C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína que possui grupo prostético constituído de ferro protoporfirina IX. Sua atividade enzimática é dependente de peróxido de hidrogênio e ocorre em condições aeróbicas, pois ela utiliza o oxigênio do ar nas reações de oxidação (RODRIGUEZ; DURÁN, 1988). LiP é uma enzima monomérica com peso molecular de 40 kDa (HAMMEL; CULLEN, 2008). Ela é capaz de oxidar vários compostos aromáticos não fenólicos como o álcool benzílico, clivar cadeias laterais desses compostos, catalisar reações de abertura de anéis aromáticos, desmetoxilação e desclorinação oxidativa (CONESSA et al., 2002).

Essa enzima é oxidada pelo peróxido de hidrogênio (fig. 6), originando um intermediário com dois elétrons oxidados (Composto I). O ferro aparece sob a forma de

Fe(IV) e um radical livre reside no anel tetrapirrólico (ou num aminoácido próximo). O Composto I oxida o substrato doador por meio de um de seus elétrons e produz um substrato-radical livre e o Composto II, no qual o ferro ainda está presente como Fe(IV), mas não há nenhum radical no anel tetrapirrólico. O Composto II oxida o segundo substrato-doador, originando outro substrato-radical livre e a enzima volta a sua conformação original (HAMMEL; CULLEN, 2008).

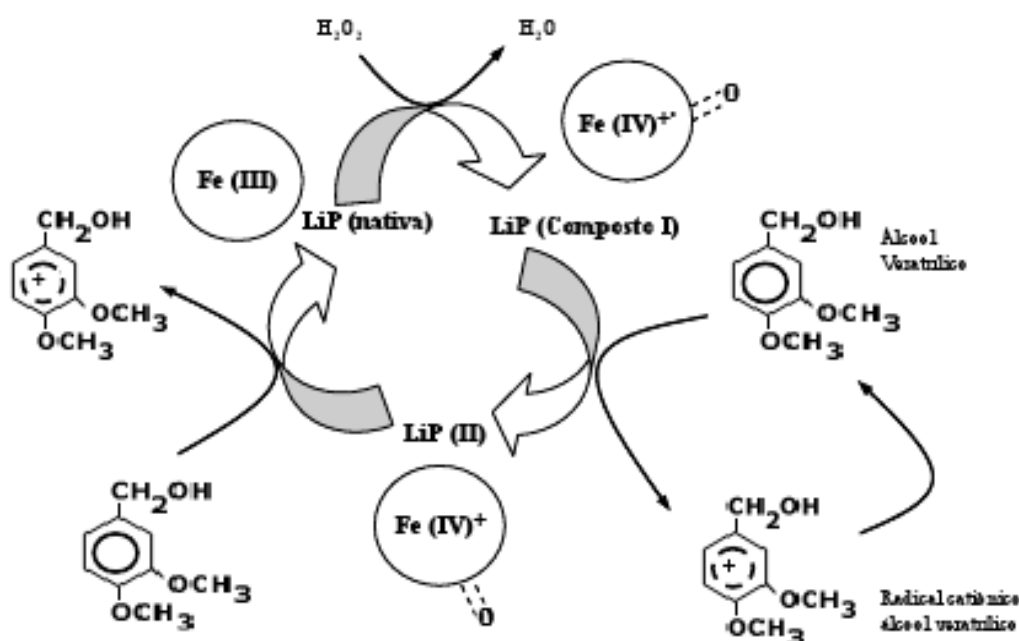


Figura 6: Ciclo catalítico da Lignina peroxidase (MOREIRA NETO, 2006)

2.3.3 Manganês Peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase (MnP, E. C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular glicosilada que possui o grupo heme como grupo prostético (STEFFEN et al., 2002). MnP é dependente de peróxido de hidrogênio, oxidando Mn^{2+} a Mn^{3+} , na presença de radicais dicarboxílicos, como oxalato, malato, fumarato e malonato (LEONOWICZ et al., 1999). Esses radicais são agentes quelantes de Mn^{3+} . Ao se complexarem, aparentemente, atuam como mediadores de baixo peso molecular que efetivamente oxidarão os compostos fenólicos da lignina (HIGUCHI, 2004; CONESSA et al., 2002; LEONOWICZ et al., 1999). O

mecanismo de reação da MnP é similar ao de outras peroxidases, como a lignina peroxidase.

Mas nesse caso, os compostos I e II da MnP oxidam Mn^{2+} (CONESSA et al., 2002) (fig. 7).

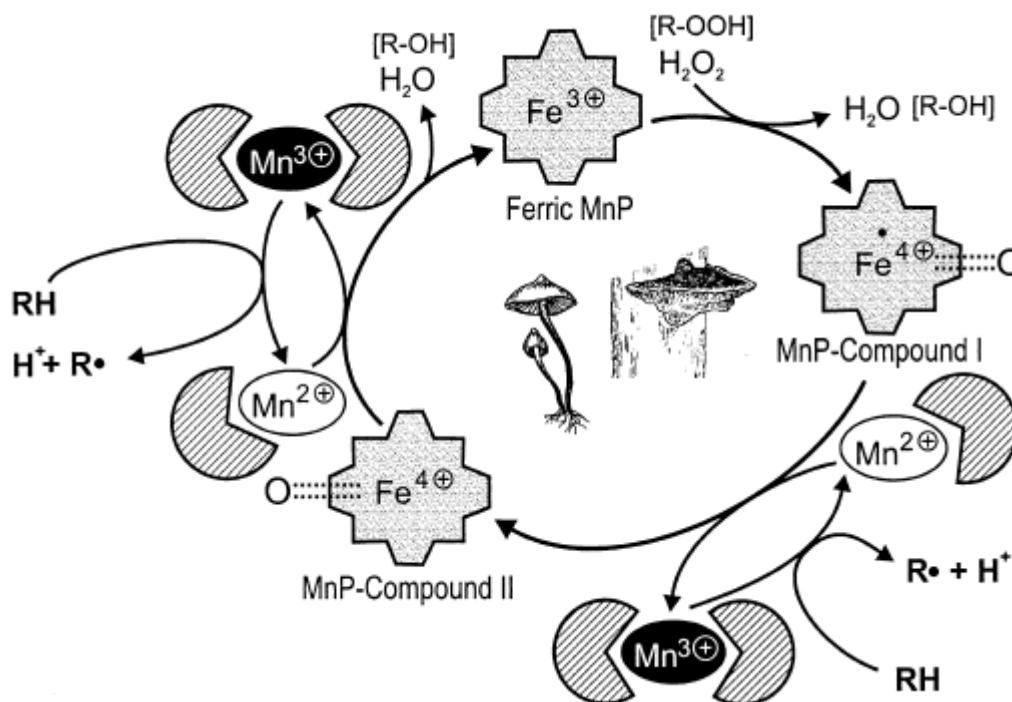


Figura 7: Ciclo catalítico da Manganês peroxidase (retirado de HOFRICHTER, 2002)

2.3.4 Fatores que interferem a atividade das ligninases

Vários fatores afetam a produção de ligninases, como a concentração de nitrogênio e/ou carbono do meio de cultura, condições de incubação do fungo (meio estático ou agitado, pH, temperatura). Para processos de descoloração de corantes têxteis, o uso de meio agitado mostra-se mais eficaz quando comparado a culturas estáticas (RIGAS; DRITSA, 2006). Por outro lado, num trabalho realizado por Faison e Kirk (1985), o uso de meio agitado inibiu a produção de ligninases e houve a formação de *pelets* miceliais. A presença de manganês também é outro fator que afeta a produção de ligninases. Tanto a ausência como o excesso desse íon inibe o sistema ligninolítico (BUSWELL et al., 1995). Alguns autores têm

demonstrado que a produção de enzimas ligninolíticas está relacionada com meios pobres em nitrogênio e carbono. Essa situação estimula os fungos da podridão branca a degradar lignina para terem acesso à celulose e hemicelulose, que são as reais fontes de carbono para o fungo (BARR; AUST, 1994; BUSWELL et al., 1995; FAISON; KIRK, 1985).

Segundo Elisashvili e outros (2008), a produção de lacase e de MnP são espécie e linhagem dependentes. Esse grupo relata que num programa de *screening* de linhagens produtoras de lacase, a sua atividade variou de 340 a 62.000 U . L⁻¹ dependendo do basidiomiceto analisado. Do mesmo modo, a natureza do substrato lignocelulósico também altera as concentrações de ligninases produzidas, pois a proporção de indutores e carboidratos cruciais para a atividade enzimática existentes nesses substratos pode variar significativamente. A presença de alguns microelementos e compostos aromáticos, como o TNT e alguns corantes, também podem acentuar a produção de ligninases, embora seus efeitos sejam específicos dependendo de peculiaridades fisiológicas de cada fungo. Esse grupo procurou demonstrar que alguns tipos de estresses como o calor e o estresse químico podem regular a secreção de lacase e manganês peroxidase. Outro fator que pode influenciar no potencial biossintético dos basidiomicetos é o sistema de cultivo, como a substituição de fermentação em estado sólido pela fermentação submersa. Do mesmo modo, o co-cultivo de espécies apropriadas de fungos pode aumentar a produção de enzimas ligninolíticas.

2.4 Aplicações dos basidiomicetos e suas ligninases em biorremediação

A aplicação de enzimas em biorremediação apresenta várias vantagens em relação aos métodos físico-químicos de remediação, pois podem ser usadas em altas ou baixas concentrações de contaminantes, num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade desde

que selecionadas as enzimas de linhagens adequadas. Ainda, a ausência de tempo associados à aclimação de biomassa, necessários quando se usa o micro-organismo diretamente, a facilidade e simplicidade de controle do processo e por ser material biológico não tóxico são propriedades muito importantes das enzimas. Entretanto, a melhor e mais econômica forma de aplicá-las é a grande questão que se levanta (KARAM; NICELL, 1997; NAGARATHNAMMA et al., 1999).

Alguns trabalhos mais recentes têm mostrado que os corantes sintéticos usados pelas indústrias têxteis são de baixa biodegradabilidade, podendo causar sérios problemas de poluição ambiental pois muitos deles são tóxicos ou carcinogênicos. A maioria desses corantes é estável à luz, temperatura e ataque por microrganismos, o que os tornam compostos recalcitrantes. Uma alternativa empregada para o tratamento dos efluentes têxteis é o uso de fungos ligninolíticos. Estudos com *Bjerkandera adusta* demonstraram que esse fungo foi capaz de descolorir completamente os corantes Orange G e Amaranth a uma concentração de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ e $3,0 \text{ g L}^{-1}$, em meio líquido, após 14 dias de inoculação do fungo. Quando a concentração do corante usado foi de $4,0 \text{ g L}^{-1}$, ao final de 28 dias, 76% dos corantes foram removidos (EICHLEVORÁ et al., 2007). Outra espécie de basidiomiceto, *Coprinellus xanthothrix*, produtora de MnP e lacase, foi capaz de degradar 28% do corante Poly R-478, em meio líquido estacionário, num período de 25 dias (DRITSA et al., 2007). Do mesmo modo, *Ischnoderma resinsum* produziu lacase e MnP em meio líquido, sendo que a MnP purificada descoloriu os corantes Reactive Black 5 (azo), Reactive Blue 19 (antraquinona), Reactive Red 22 (azo) e Reactive Yellow 15 (azo), mas com baixa eficiência. Por outro lado, a lacase purificada só descoloriu os corante Reactive Blue 19 e Reactive Yellow 15 (KOKOL et al., 2007).

Os fungos da podridão branca podem ser também empregados na descontaminação do solo, degradando compostos xenobióticos presentes nele. Esse processo

pode ocorrer tanto pela mineralização desses compostos a CO₂ (biorremediação), como na sua decomposição a compostos menos poluentes (biotransformação). Barr e Aust (1994), em um artigo de revisão sobre os mecanismos usados pelos fungos da podridão branca para degradação de poluentes, listaram vários compostos xenobióticos degradados pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), compostos aromáticos clorados, pesticidas, corantes, munição, cianidas e azidas. Em outro estudo, o basidiomiceto *Lentinula edodes* foi capaz de degradar 99% de pentaclorofenol em 10 semanas, quando cultivado em monocultura, e essa habilidade decaiu para 42% quando ele teve que competir com a microbiota nativa do solo. Esse estudo também mostrou que *L. edodes* degradou pentacloroanisol concomitantemente (OKEKE et al.,1997).

Pesticidas (herbicidas, fungicidas e inseticidas) têm sido muito usados em todo o mundo apesar de seus efeitos negativos sobre o ambiente serem enormes. Tais efeitos incluem os resíduos formados durante sua produção, transporte, armazenamento e aplicação. As medidas mais adotadas para a degradação desses produtos são de alto custo e podem gerar outros resíduos tóxicos (KARAM; NICELL, 1997). Bending e outros (2002) mostraram que nove espécies de basidiomicetos, dentre eles *Agrocybe semiorbicularis*, *Coriolus versicolor*, *Hypholoma fasciculare* e *Stereum hirsutum*, do grupo dos fungos da podridão branca, foram capazes de degradar os herbicidas diurom, metalaxil, atrazina e terbutilazina. Os autores concluíram que os mecanismos de degradação desses herbicidas são similares, embora suas características sejam diferentes.

2.5 Fungos Halotolerantes

Existem, fundamentalmente, duas estratégias que permitem aos micro-organismos suportarem o estresse osmótico proveniente da hipersalinidade. I) os micro-organismos

conseguem manter uma alta concentração salina no meio intracelular, ao menos equivalente ao do meio externo. Nesse caso, todas as estruturas celulares deverão ser adaptadas à hipersalinidade do meio intracelular. Essa estratégia é utilizada por dois grupos de organismos: Archaea halofílicas aeróbicas da ordem Halobacteriales e bactérias halofílicas anaeróbicas da ordem Haloanaerobiales. II) as células microbianas conseguem manter o meio intracelular com baixa concentração de sal. A pressão osmótica no interior da célula é balanceada por solutos orgânicos compatíveis. Entre esses solutos podem ser citados: glicerol, trealose, glicina betaína. (OREN, 1999).

Matsuda e outros (2006) estudaram a tolerância de quatro espécies de ectomicorizas à salinidade. *Pisolithus tinctorius* e *Rhizopogon rubescens* não demonstraram diferenças significativas no crescimento micelial em meio líquido contendo 0 mM ou 200 mM de NaCl. Porém, essas concentrações foram significativas para o crescimento de *Cenococcum geophilum* e *Suillus luteus*, nos quais houve uma inibição do crescimento conforme aumentou-se a concentração salina do meio de cultura. Castillo e Demoulin (1997) mostraram que o fungo *Schizophyllum commune* tolerou meio de cultura com uma concentração alta de NaCl (70 g . L⁻¹) e o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* teve seu crescimento inibido em meio com concentração de salina igual a 60 g . L⁻¹. Outro estudo apontou que a maioria das linhagens do basidiomiceto *Formitopsis pinicola*, foram capazes de crescer em meio contendo mais de 0,8 M de NaCl (aproximadamente 47 g . L⁻¹). Essa propriedade, segundo os autores, está relacionada com a presença de proteínas carreadoras antiporte de Na⁺/H⁺ (MIYAZAKI et al., 2007).

Um fungo da podridão branca, isolado de região de mangue do Japão e identificado como pertencente ao gênero *Phlebia* sp, mostrou aumento na produção de MnP em meio com concentração de 3% e 5% de sal marinho e redução na produção de lacase. Esse estudo também apontou que o sal marinho utilizado foi capaz de atenuar a inibição causada

por Mn^{2+} e por NH_4^+ na produção de MnP e aumentou a descoloração do corante Poly R-478 (LI et al., 2003b). Esse mesmo fungo foi utilizado no processo de branqueamento da polpa de papel, demonstrando que a enzima MnP foi tolerante aos altos teores de sais e materiais orgânicos presente no meio (LI et al., 2003a).

Um estudo realizado por Leitão e outros (2007) demonstrou que o fungo *Penicilium chrysogenum*, isolado de uma salina em Portugal, foi capaz de degradar totalmente fenol numa concentração de $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ num período de 100 horas, em meio líquido contendo 5,9% de NaCl e agitação de 160 rpm. Os autores do trabalho sugerem que essa linhagem de *Penicilium* pode ser uma boa alternativa para o tratamento biológico de efluentes contendo fenol, como o das indústrias petroquímicas.

2.6 Solutos Compatíveis

Solutos compatíveis são definidos como compostos orgânicos de pequena massa molecular que se acumulam na célula como resposta ao estresse osmótico do meio (EMPADINHAS et al., 2008). Eles recebem essa denominação porque precisam ser compatíveis com a maquinaria celular, ou seja, não devem afetar o funcionamento fisiológico da célula. Assim, acabam desempenhando a função de proteção contra inativação, inibição e desnaturação de enzimas e macromoléculas sob condições de baixa atividade de água. São compostos polares, normalmente sem carga ou zwitteriônicos nas condições encontradas no meio intracelular. Pertencem a várias classe de compostos, como: (I) polióis como glicerol, arabitol, manitol, açúcares e derivados de açúcares, como trealose, sacarose, sulfutralose e glicosilglicerol; (II) betaínas e tetinas; (III) aminoácidos, incluindo prolina, glutamato e glutamina; (IV) aminoácidos N-acetilados; (V) derivados de aminas glutaminas; (VI) ectoínas (Fig. 8) (GRANT, 2004).

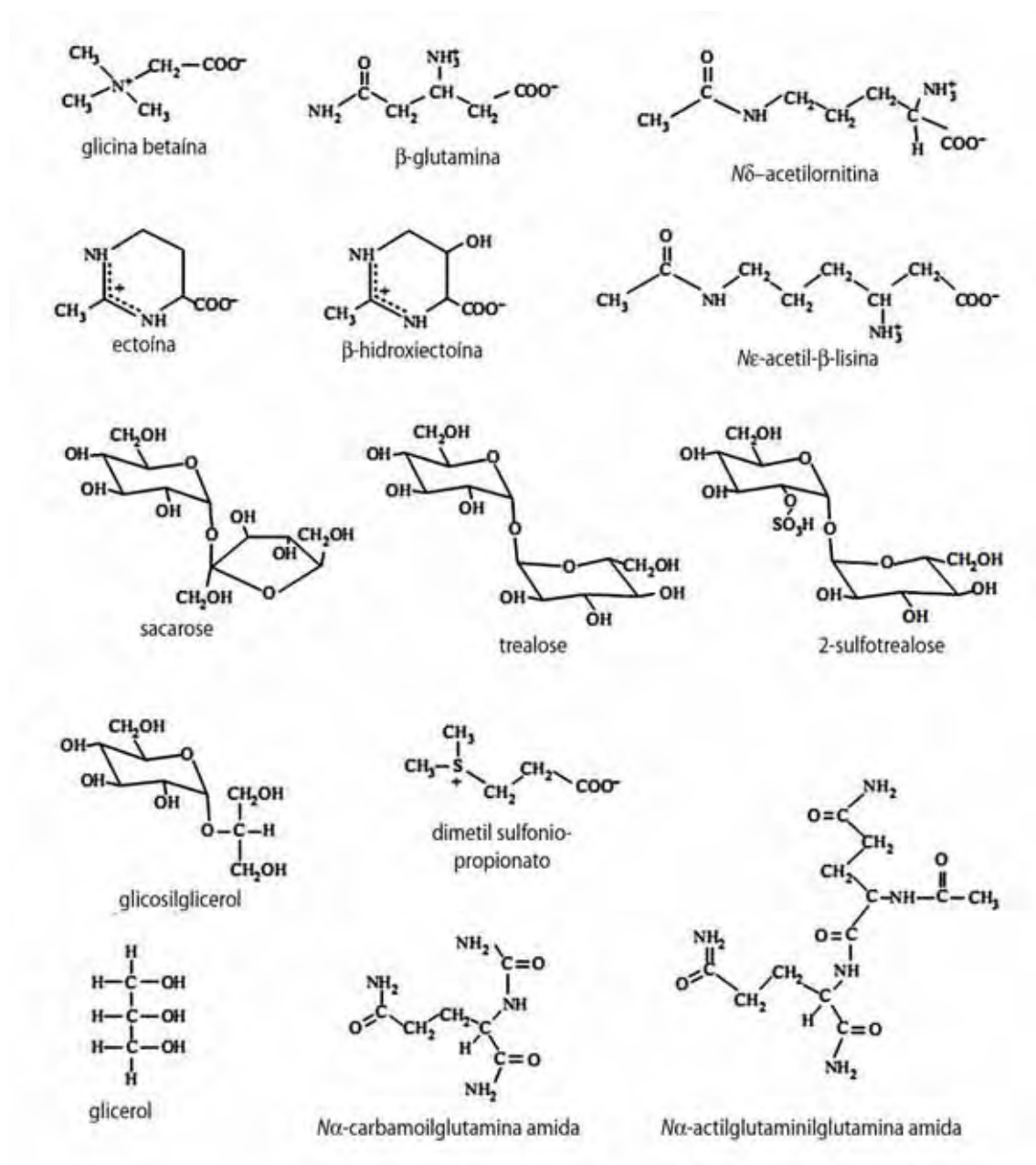


Figura 8: Exemplos de compostos que atuam como solutos compatíveis (GRANT, 2004).

A produção de biodiesel gera glicerol bruto como subproduto. Esse composto não tem grande capacidade energética e deve ser destinado. Assim, buscando alternativas para o seu reaproveitamento, vem se estudando a sua utilização na ressíntese de óleos por micro-organismo, como os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina* (FAKAS et

al., 2009). Esse estudo mostrou que aumentando-se a razão C/N, através do incremento da concentração de glicerol bruto, verifica-se uma maior produção de biomassa. Assim, observa-se que tais linhagens têm seu crescimento estimulado pelo aumento da concentração de glicerol no meio.

2.7 Degradação de Diurom

O diurom (CAS 330-54-1; 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia) (fig. 9) é um herbicida pertencente à classe das fenilamidas, subclasse das feniluréia, é um cristal incolor quando em sua forma pura. Suas características físico-químicas sugerem que esse composto não é volátil na água e nem no solo (GIACOMAZZI; COCHET, 2004). Ele é muito indicado para o controle de plantas daninhas em pós e pré-emergência. No Brasil, é utilizado em várias culturas, como algodão, abacaxi, café, citros e cana-de-açúcar (TOMAZ, 2003). Esse herbicida age sobre o fotossistema II dos cloroplastos das plantas, ligando-se firmemente ao sítio de ligação da quinona B, existente neste fotossistema. Isso bloqueia a transferência de elétrons da quinona A para a B e afeta o fluxo de elétrons nesse fotossistema (HAYNES et al., 2000).

A poluição das águas e solo por diurom tem se tornado um sério problema, devido à formação de 3,4 DCA (3,4-dicloroanilina), composto tóxico que está sujeito à lixiviação e bioacumulação (GIACOMAZZI; COCHET, 2004). Este herbicida é prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal de ratos e cães, porém não há registros de sua acumulação em seus tecidos (LIU, 2010).

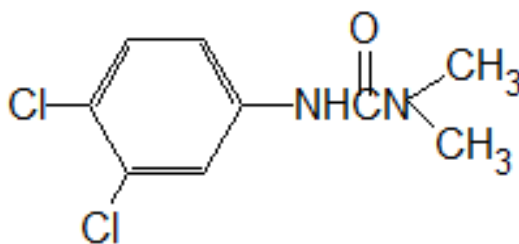


Figura 9: Fórmula estrutural do diurom.

Há estudos demonstrando que micro-organismos são capazes de degradar herbicidas. Khadrani e outros (1999) estudaram a capacidade de várias linhagens de leveduras ascomicetos e basidiomicetos em degradar os herbicidas clortoluron, isoproturon e diurom. Entre esses organismos, os que se mostraram mais eficientes nessa tarefa foram os basidiomicetos, com os fungos *Bjerkandera adusta*, *Oxysporus sp*, *Phlebia radiata* e *Trametes sp*, degradando, respectivamente, 82%, 64%, 82% e 72% do herbicida diurom. Em outro estudo, realizado por Bending e outros (2002), foi observado que o fungo *Coriolus versicolor* degradou quase completamente o herbicida diurom e, *Hypholoma fasciculare*, *Stereum hirsutum* e *Agrocybe semiorbicularis* apresentaram entre 70% e 80% de degradação desse herbicida. Nesse estudo, os autores não conseguiram correlacionar a capacidade desses fungos da podridão branca degradar herbicida com a sua produção de enzimas ligninolíticas.

Tomaz (2003) verificou que espécies de *Pleurotus* foram capazes de degradar acima de 50% de diurom, quando esse herbicida foi utilizado como fonte de carbono. Esses fungos apresentaram alta atividade de MnP, podendo estar relacionada, juntamente com outros complexos enzimáticos, com a degradação desse herbicida. Do mesmo modo, Espósito e outros (1998) apontam a MnP como a enzima responsável pela oxidação de diurom em linhagens de actinomicetos. A linhagem denominada CCT 4916 apresentou a uma alta atividade enzimática e um alto índice de degradação de diurom, indicando que a MnP foi responsável pela degradação do herbicida.

2.8 Justificativa

As interferências da osmolaridade no crescimento, atividade enzimática e degradação do herbicida diurom não são muito conhecidas. Entretanto, esse fator é significativa importância para a fisiologia dos micro-organismos, visto que meios com hipertônicos podem levar à ruptura celular. Além disso, a concentração de solutos nos efluentes, em geral, é alta, afetando a sua osmolaridade.

Os fatos expostos trazem a necessidade de buscar respostas para o comportamento dos micro-organismos em meios com baixa atividade de água, a fim de conhecer seus efeitos sobre a fisiologia desses seres e otimizar sua aplicação nos processos de biorremediação.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Esse trabalho teve por objetivo realizar um *screening* de linhagens fúngicas halotolerantes e estudar o comportamento fisiológico do basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 em meio com baixa atividade de água, assim como sua capacidade de produção de enzimas ligninolíticas e degradação do herbicida diurom em tal condição.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Realizar um *screening* com linhagens de basidiomicetos existentes na coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE/ UNESP, com o intuito de selecionar linhagens halotolerantes.
- Estudar a capacidade do fungo *Dacryopinax elegans* SXS323 em crescer em meio com baixa atividade de água, proporcionada pela adição de cloreto de sódio 0,5M, manitol 0,5M ou glicerol 0,5M ao meio de cultura;
- verificar se houve produção pelo fungo de enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) nesse ambiente de baixa atividade de água;
- avaliar a capacidade do basidiomiceto em degradar o herbicida diurom nas condições estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

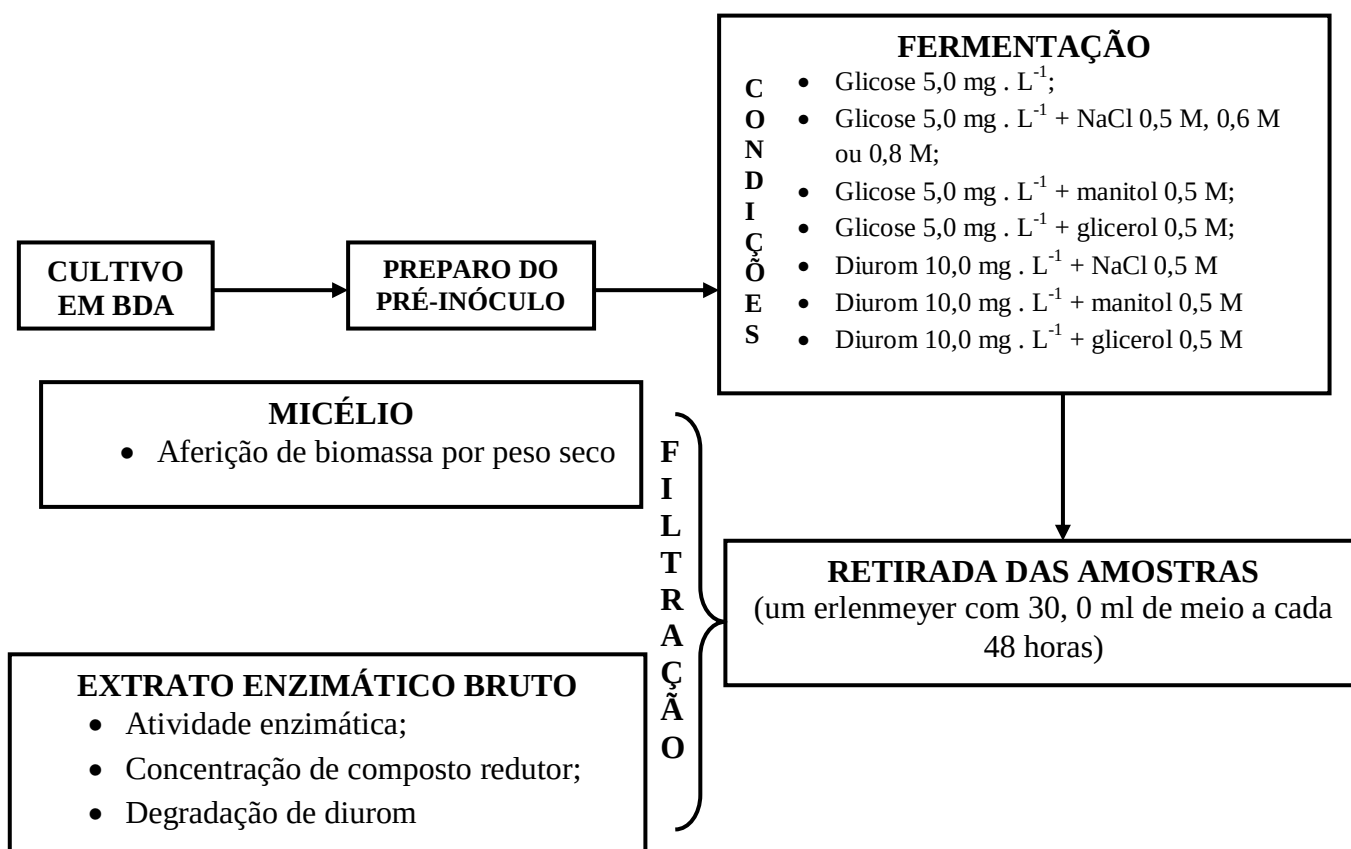


Figura 10: Fluxograma das atividades executadas.

4.1 MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram estudados os fungos basidiomicetos *Datronia caperata* MCA5, *Datronia stereioides* MCA167, *Dracryopinax elegans* SXS323, *Gloeophyllum striatum* MCA2 e MCA7, *Hexagonia hirta* MCA131, *Polyporus sp* MCA128, *Polyporus tenuiculus* MCA9 e MCA11, e *Pycnoporus sanguineus* MCA16, isolados a partir de troncos de árvores em decomposição na mata remanescente da Estação Ecológica do Noroeste Paulista, nos municípios de São José do Rio Preto e Mirassol, no Estado de São Paulo (SANTOS et al., 2004, ABRAHÃO et al., 2008). As exsiccatas desse isolamento encontram-se depositadas no Herbário do IBILCE/ UNESP, de São José do Rio Preto/ SP, e as culturas

puras no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE/ UNESP, mantidas a partir de esporos ou por fragmento micelial, sendo preservados pelo método Castellani, em câmara fria e conservada em água destilada e/ ou em resfriamento a -80°C , imersos em solução deglicerol 20%.

4.2 MEIOS DE CULTURA E TAMPÃO DE KNAPP

Os fungos foram previamente inoculado em meio sólido de batata-dextrose-água (BDA). O meio líquido basal utilizado continha ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 5,0 de glicose; 2,0 de extrato de levedura; 1,0 de tartarato de potássio e sódio; 1,0 de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,5 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 de KCl e 1,0 mL de solução de elementos traço. A solução de elementos traço foi composta por ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 1,0 de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,05 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,07 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. O pH foi ajustado para 5,5 (ZOUARI-MECHICHI, 2006, modificado).

Para lavar o micélio durante a preparação do pré-inóculo, foi utilizado tampão de Knapp, cuja composição conteve ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 1,0 de KH_2PO_4 , 1,0 de K_2HPO_4 , 0,0265 de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,0407 de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com pH ajustado para 6,6 (MONARD et al., 2008, modificado).

4.3 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido BDA até que o micélio ocupasse mais de metade da superfície da placa. Nesse estágio, a superfície do meio era levemente raspada para remover o micélio superficial, tomando-se o cuidado para não

remover o BDA. Metade da cobertura micelial superficial foi inoculado em frasco Erlenmeyer (125 mL) contendo 30 mL de meio líquido e incubado a 28° C por 5 dias. Esse micélio foi lavado, utilizando-se o tampão de Knapp, homogeneizado com auxílio de um blender e diluído também em tampão de Knapp. O homogeneizado foi diluído até que a sua leitura em espectrofotômetro atingisse uma absorbância de 0,5 em 550 nm. Foi utilizada apenas a solução-tampão como branco (HENN, 2009).

4.4 CULTIVO DOS FUNGOS

Os fungos foram fermentados em BOD a 28° C $\pm$ 2° C por 10 dias sob agitação de 40 rpm. As fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyer de 125 mL, nos quais acrescentou-se 30 mL de meio líquido basal. Sob condições estéreis, uma alíquota de 1,0 mL da solução do pré-inóculo foi adicionada a esse meio. Foram preparados 5 erlenmeyers em cada experimento, com retirada de um dos frascos para as devidas análises em intervalos de 48 horas, totalizando-se 240 horas. Cada fermentação foi repetida ao menos uma vez e até o máximo de três repetições.

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EXTRACELULAR E AFERIÇÃO DA BIOMASSA

Cada Erlenmeyer foi filtrado a vácuo, utilizando-se papel filtro. O filtrado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto para as dosagens das enzimas extracelulares, dosagem de compostos redutores e para as análises de degradação dos herbicidas.

A aferição da biomassa fúngica foi feita por peso seco. O micélio retido nos papéis de filtro foi lavado em água destilada e em seguida, colocado em estufa a 60° C. Em intervalos de 24 horas, os papéis de filtro foram pesados em balança analítica. Esse procedimento repetiu-se até que o peso constante fosse atingido. Os papéis de filtro foram mantidos em estufa e pesados previamente à sua utilização na filtração do meio de cultura. A biomassa foi calculada pela diferença entre a massa do papel de filtro juntamente com o micélio e a massa do papel antes da filtração.

4.6 CONDIÇÃO DE BAIXA ATIVIDADE DE ÁGUA

O efeito da atividade de água sobre a fisiologia dos fungos foi avaliado utilizando-se cloreto de sódio, manitol e glicerol como solutos. Esse experimento foi realizado como indicado no item 4.4, porém, ao meio de cultivo foi adicionado soluto até concentração de 0,5 M. O controle do experimento foi conduzido conforme descrito no item 4.4.

4.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DE LIGNINASES DE *Dacryopinax elegans* SXS323

4.7.1 Lacase

A atividade de lacase foi determinada a 40°C usando 2,2'-azino-bis-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) como substrato, em mistura contendo 0,1mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,5); 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v); e, 0,1 mL de solução enzimática bruta (BUSWELL et al, 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm, com um tempo de reação de 1,0

minuto. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS; PAICE, 1988). As dosagens foram realizadas em triplicatas.

4.7.2 Manganês peroxidase (MnP)

A atividade de MnP na solução enzimática bruta foi determinada a 40°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio 0,05 M (pH 3,5); 0,1 mL de solução de MnSO_4 0,5 mM; e, 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 μM), tendo duração de 10,0 minutos, e a absorbância medida a 240 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $8,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (GLENN et al, 1986; AITKEN; IRVINE, 1990). As dosagens foram realizadas em triplicatas.

4.7.3 Lignina peroxidase (LiP)

A atividade de LiP na solução enzimática bruta foi determinada a 30°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão tartarato dissódico 0,05 M (pH 3,0); 0,1 mL de solução de álcool veratrílico 40 mM e 0,1 mL de solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM), tendo duração de 10,0 minutos, e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, foi medido a 310 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para

formar 1 μmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (TIEN, KIRK, 1988). As dosagens foram realizadas em triplicatas.

4.8 CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada pela seguinte equação:

$$U = \frac{\frac{A}{\varepsilon}}{v \cdot \Delta t} \cdot 10^6$$

onde, U= atividade enzimática ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

A= variação da absorbância (ΔAbs)

ε = coeficiente absorvidade molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

v= volume de extrato enzimático utilizado na reação (ml)

Δt = variação do tempo de reação(min)

4.9 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA CONTENDO DIUROM

A linhagem *Dacryopinax elegans* SXS323, dada sua capacidade de crescer em meio salino, foi testada para avaliar a degradação do herbicida diurom, sob as condições de baixa atividade de água. Os meios, sob as condições descritas no item 4.4 e 4.6, foram acrescidos do herbicida na concentração de $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. O controle desse experimento foi realizado nas mesmas condições do meio, porém em ausência do herbicida. Para os ensaios com o herbicida, foi utilizado o diurom comercial, Karmex[®] (DuPont), com uma concentração do princípio ativo de 80% (m/m) e de ingredientes inertes de 20% (m/m). Primeiramente, uma solução estoque de $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi preparada, dissolvendo-se o diurom em metanol e fazendo-se as correções de concentração. Essa solução passou por dois pulsos de 15 minutos

em sonificador. Em seguida, ela foi centrifugada a 25° C e 10000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi esterelizado por filtração através de membranas Milipore com poros de 0,2 µm de diâmetro. Finalmente, volumes adequados da solução estoque foram dispensados em erlenmeyer de 125 mL, previamente autoclavados. Após a evaporação do metanol, 30 ml de meio foi adicionado a cada erlenmeyer. Antes de acrescentar o inóculo em cada erlenmeyer, 1,0 ml do meio era retirado, guardado em tubos eppendorf e em seguida congelado para posterior análise em HPLC. Essas alíquotas foram numeradas, e o frasco do qual foram retirados receberam a mesma numeração. Assim, elas foram usadas como controle abiótico do experimento, sendo a concentração de diurom encontrada nessas alíquotas consideradas como concentração inicial de cada amostra inoculada correspondente analisada (HENN, 2009, modificado). Para cada condição, o experimento foi repetido uma vez.

4.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DOS FUNGOS DE DEGRADAR DIUROM

As análises de uma possível degradação do herbicida diurom foram realizadas em HPLC Jasco bomba PU980, acoplado a um detector UV/ Vis UV-975. Os cromatogramas foram analisados utilizando-se o software StarChromatography 4.0 Varian. Previamente às análises, as amostras, que foram guardadas sob congelamento após a retirada das culturas, foram descongeladas e filtradas em membranas Millipore de 0,22 µm. As análises foram realizadas em coluna PerkinElmer C18 (250 mm x 4,6 mm; tamanho da partícula, 5 µm), injetando-se um volume de 20 µL de amostra por leitura. As corridas duraram 10 minutos, sob um fluxo de 1,0 mL . min⁻¹ com eluição isocrática e fase móvel composta por acetonitrila e água mili-Q, na proporção de 60:40 (v/v), respectivamente. O detector foi ajustado para o comprimento de onda de 240 nm. As dosagens foram realizadas em triplicatas. Para as

análises m HPLC foi utilizado padrão analítico Aldrich Chemistry (diurom, 99% de pureza) diluído em água nas concentrações de $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.11 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE COMPOSTOS REDUTORES

Para averiguação do consumo de açúcar durante a fermentação foi determinada a concentração de compostos redutores no meio de cultura. A determinação da quantidade de compostos redutores foi avaliada utilizando-se a metodologia de Somogy-Nelson. As dosagens foram realizadas em tubos de ensaio partindo-se de um volume de 0,5 mL de extrato enzimático bruto, adicionando-se 1,0 mL da solução SNI. Esse tubo foi fervido em banho de ebulição por 10 minutos. Em seguida, ele foi transferido para o banho de gelo, no qual permaneceu por 5 minutos. Após esse período, o tubo de ensaio foi retirado do banho de gelo e acrescentou-se 1,0 mL da solução SNII. O conteúdo do tubo foi agitado manualmente, seguido de um repouso de 5 minutos. Por fim, foram adicionados 10 mL de água destilada e homogeneizou-se o conteúdo do tubo agitando-no com o auxílio de um vórtex. A leitura do tubo foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Esse experimento foi conduzido em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Crescimento micelial em meio contendo NaCl 0,5 M

O comportamento do crescimento micelial das dez linhagens estudadas foi, inicialmente, analisado em meio líquido levemente agitado contendo NaCl 0,5 M ou na ausência do sal. Posteriormente, dada sua melhor capacidade de crescimento sob essas condições, aferida pela biomassa seca, a linhagem *Dacryopinax elegans* SXS323 foi selecionada para analisar o efeito do glicerol e do manitol sob seu crescimento, atividade enzimática, dosagem de compostos redutores e capacidade de degradação do herbicida diurom.

Nas condições desse ensaio, foi possível agrupar as linhagens de acordo com o grau de inibição do crescimento médio observado no tempo de 240 horas, comparando-se a biomassa seca dos fungos em meio sem sal e em meio com 0,5M de NaCl. Por esse critério atribuiu-se a formação de três grupos. O primeiro grupo representado por linhagens fortemente inibidas em meio salino, como *Datronia caperata* MCA5, *Gloeophyllum striatum* MCA 2 e MCA7, e *Hexagonia hirta* MCA131. O segundo grupo, apresentando inibições intermediárias no crescimento micelial: *Polyporus tenuiculus* MCA9 e MCA11 e, *Pycnoporus sanguineus* MCA16. O terceiro grupo, englobando as linhagens *Datronia stereioides* MCA167, *Dacryopinax elegans* SXS323 e *Polyporus sp* (MCA128) que apresentaram melhor crescimento no meio salino (tab. 2).

Tabela 2: Agrupamento das linhagens fúngicas de acordo com o seu comportamento de crescimento micelial em meio líquido contendo NaCl 0,5M, apresentado no tempo de 240 horas. Valores médios±desvio padrão

LINHAGEM	MEIO SEM NaCl	MEIO COM NaCl 0,5 M	
	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO/ ESTÍMULO DO CRESCIMENTO (%)*
Inibição do crescimento micelial superior a 80%			
<i>Datronia caperata</i> MCA5	1,18±0,13	0,06±0,08	-94,92
<i>Gloeophyllum striatum</i> MCA7	2,51±0,30	0,15±0,18	-94,02
<i>Hexagonia hirta</i> MCA131	1,54±0,34	0,14±0,19	-90,91
<i>Gloeophyllum striatum</i> MCA2	1,79±0,39	0,25±0,06	-86,03
Inibição do crescimento micelial inferior a 80%			
<i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA16	2,22±0,23	0,56±0,28	-74,77
<i>Polyporus tenuiculus</i> MCA9	0,48±0,23	0,18±0,25	-62,50
<i>Polyporus tenuiculus</i> MCA11	1,02±0,15	0,44±0,10	-56,86
Estímulo do crescimento micelial			
<i>Polyporus sp.</i> MCA128	2,72±0,53	3,00±0,29	+10,29
<i>Datronia steroides</i> MCA167	2,63±0,21	3,25±0,69	+23,57
<i>Dacryopinax elegans</i> SXS323	0,85±0,47	1,09±0,13	+28,24

* O sinal negativo (-) indica que houve inibição do crescimento micelial e o sinal positivo (+), estímulo do crescimento, em relação ao meio sem sal.

O grupo com crescimento fortemente inibido no tempo de 240 horas apresentou taxas que variaram de 80% até quase 100% de inibição. O fungo *Datronia caperata* MCA5 (fig. 11) atingiu seu maior crescimento com 240 horas, registrando-se uma biomassa de 1,18 g . L⁻¹ e de 0,06 g . L⁻¹ de meio sem sal e meio com NaCl 0,5 M, respectivamente. A inibição do crescimento nesse tempo foi de 94,92% (tab. 2). O fungo *Gloeophyllum striatum* MCA7 (fig. 12) teve seu maior desenvolvimento micelial com 240 horas, apresentando uma inibição de 94,02% e biomassa de 2,51 g . L⁻¹ no meio sem NaCl e de 0,15 g . L⁻¹ no meio com 0,5 M desse sal (tab. 2). Do mesmo modo, a linhagem *Gloeophyllum striatum* MCA2 (fig. 13) teve inibição de 86,03% e sua biomassa média em meio sem sal e na presença dele no tempo de 240 horas foi, respectivamente, de 1,78 g . L⁻¹ e 0,25 g . L⁻¹ (tab. 2). Outra linhagem que teve seu crescimento bastante inibido sob as mesmas condições foi *Hexagonia hirta* MCA131 (fig.

14), com uma inibição de 90,91% no tempo de 240 horas. Ela apresentou uma biomassa de $1,54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio não-salino e de $0,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em meio salino (tab 2).

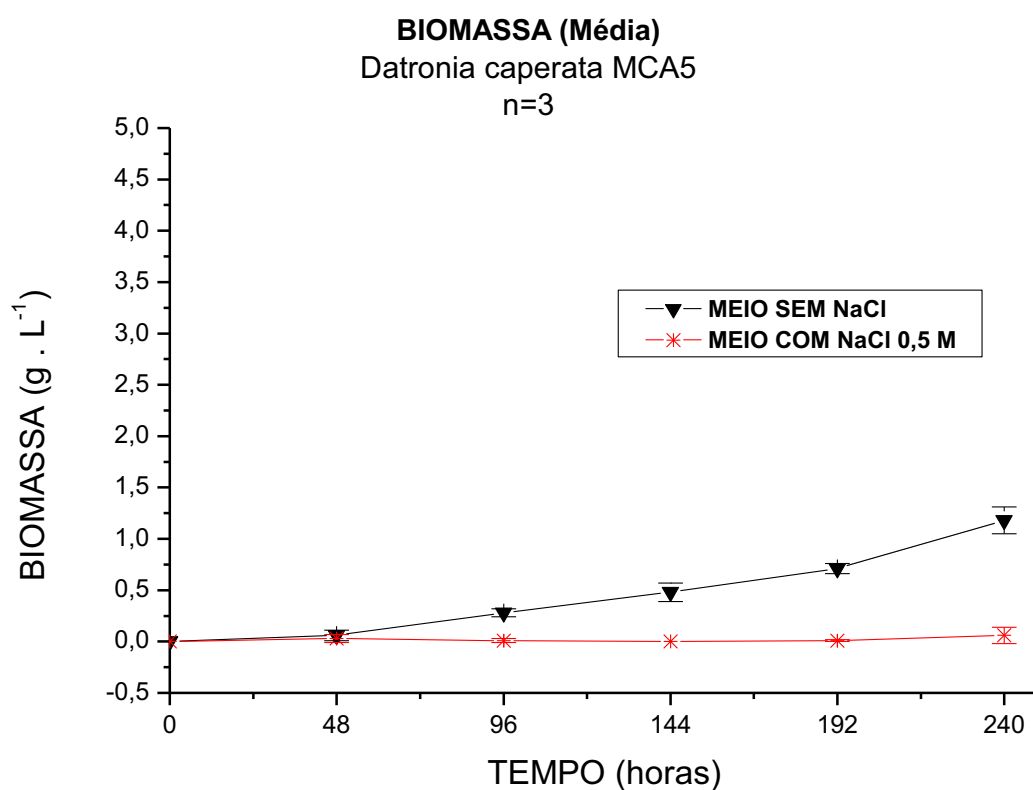


Figura 11: Curva de crescimento da linhagem *Datronia caperata* MCA5, um dos fungos que apresentaram forte inibição do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

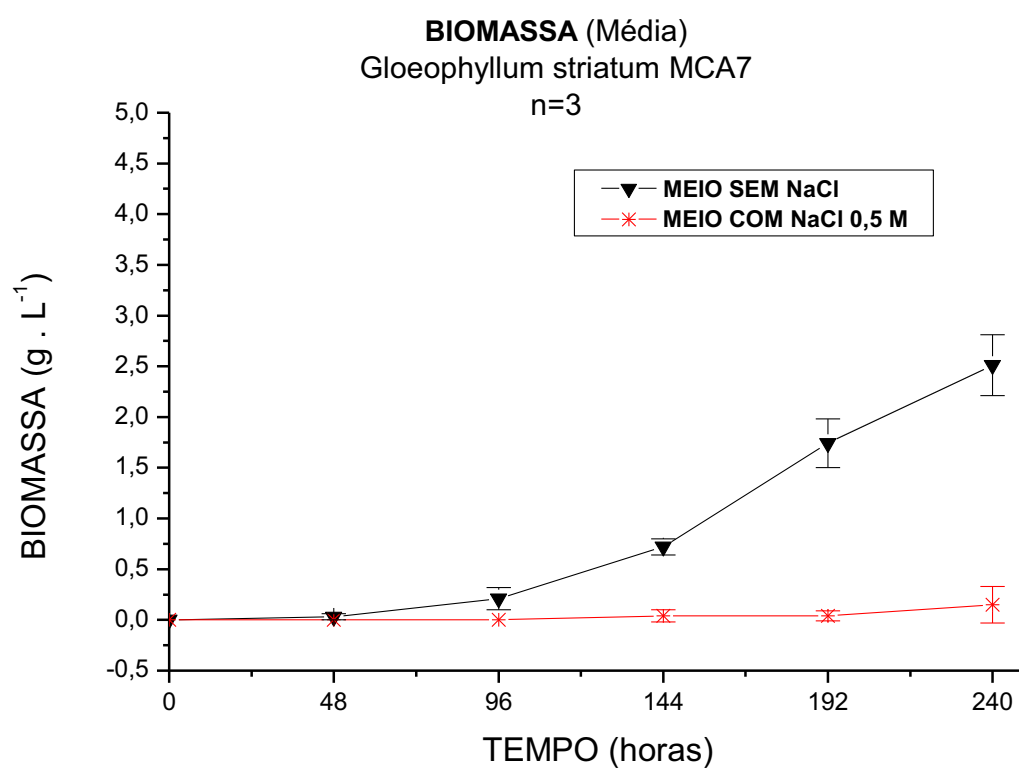


Figura 12: Curva de crescimento da linhagem *Gloeophyllum striatum* MCA7, apresentando forte inibição em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

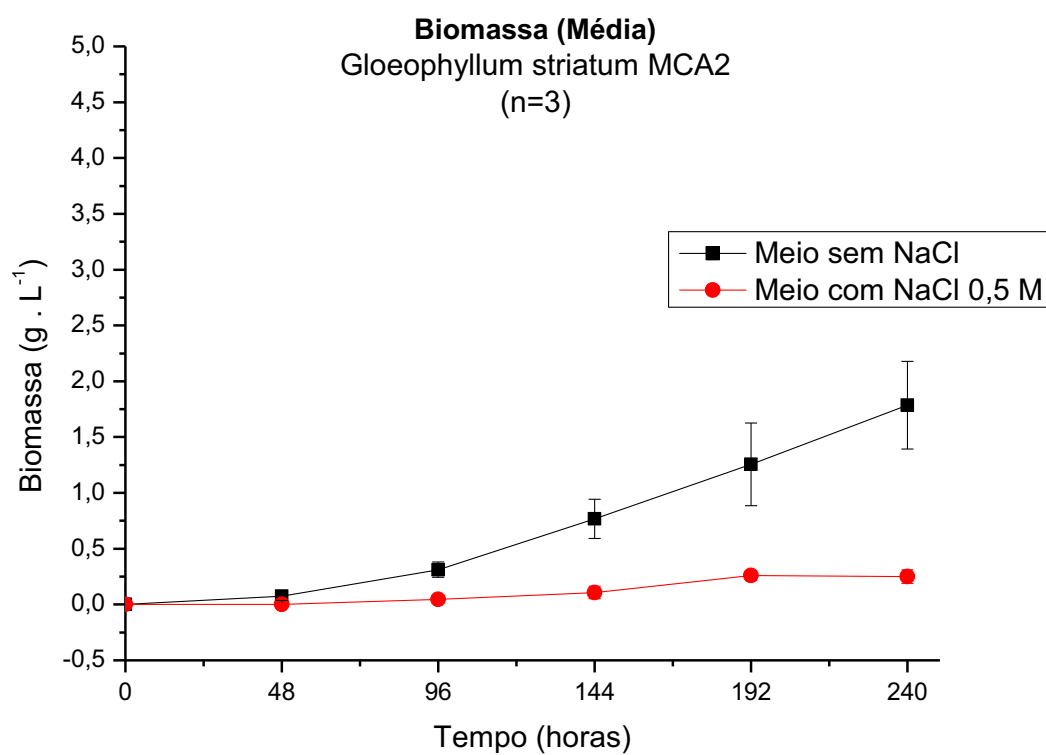


Figura 13: Curva de crescimento da linhagem *Gloeophyllum striatum* MCA2, que apresentou forte inibição em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

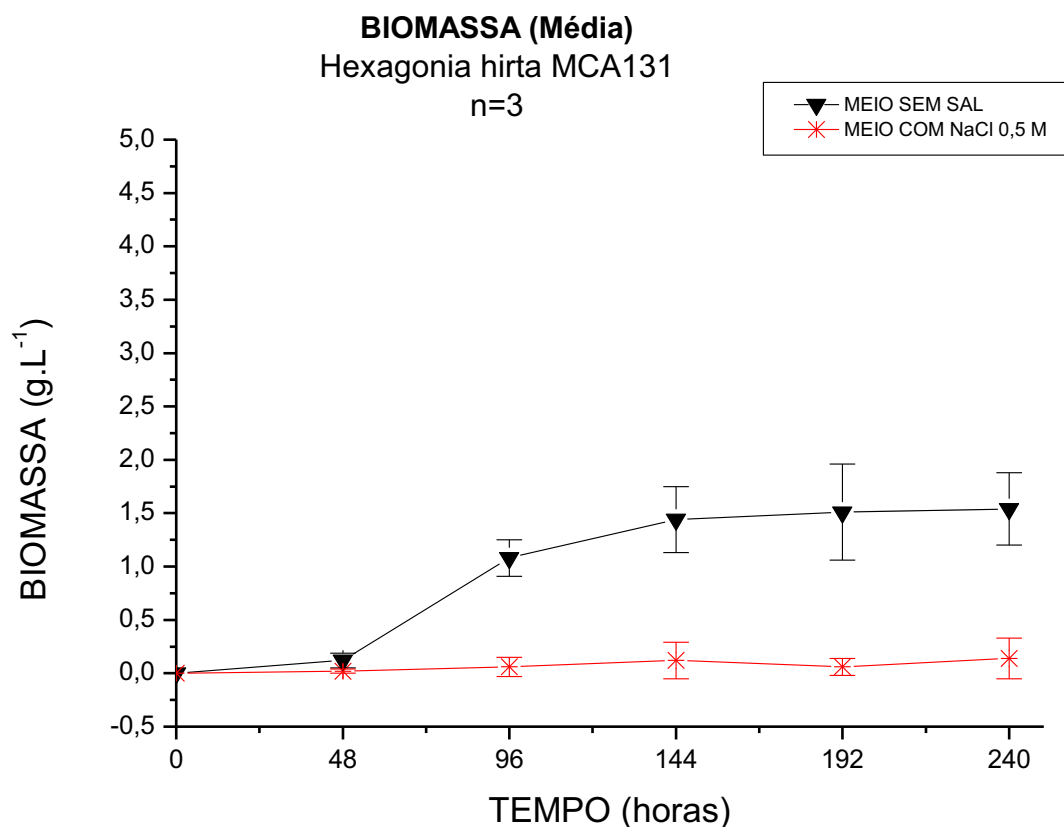


Figura 14: Curva de crescimento da linhagem *Hexagonia hirta* MCA131, que apresentou forte inibição em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

As linhagens que apresentaram crescimento inibido, mas com taxas inferiores a 80% formam o segundo grupo. Com 74,84% de inibição, *Pycnoporus sanguineus* MCA16 (fig. 15) teve biomassa de 2,22 g . L⁻¹ no meio sem sal e 0,56 g . L⁻¹, no meio com sal em 240 horas (tab. 2). As duas linhagens de *Polyporus tenuiculus* foram menos inibidos do que o *P. sanguineus*. A linhagem MCA9 (fig. 16) registrou 62,5% de inibição. O seu crescimento foi de 0,48 g . L⁻¹ (meio sem sal) e de 0,18 g . L⁻¹ (meio salino) (tab. 2). Já a linhagem MCA11 (fig. 17) apresentou inibição menor (56,86%) e biomassa maior (1,02 g . L⁻¹ e 0,44 g . L⁻¹, respectivamente para os meios com e sem NaCl) do que *P. tenuiculus* MCA9 (tab. 2).

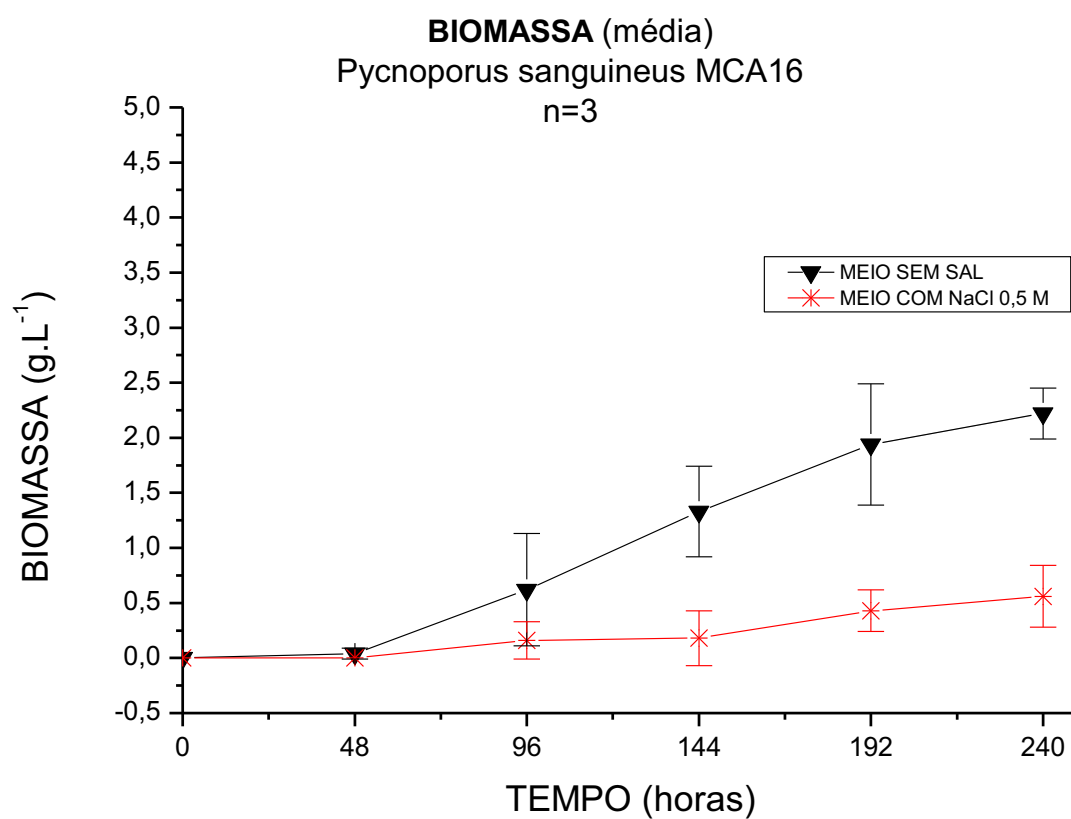


Figura 15: Curva de crescimento da linhagem *Pycnopus sanguineus* MCA16, que apresentou inibição intermediária em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

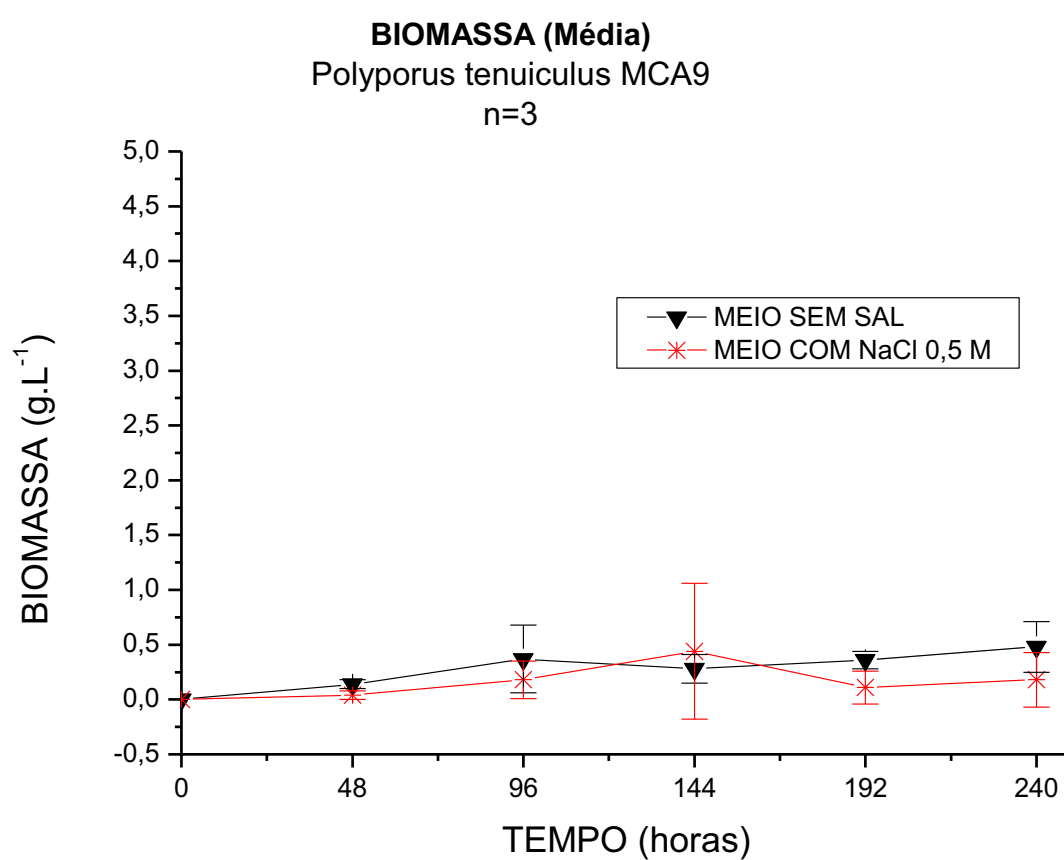


Figura 16: Curva de crescimento da linhagem *Polyporus tenuiculus* MCA9, que apresentou inibição intermediária em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

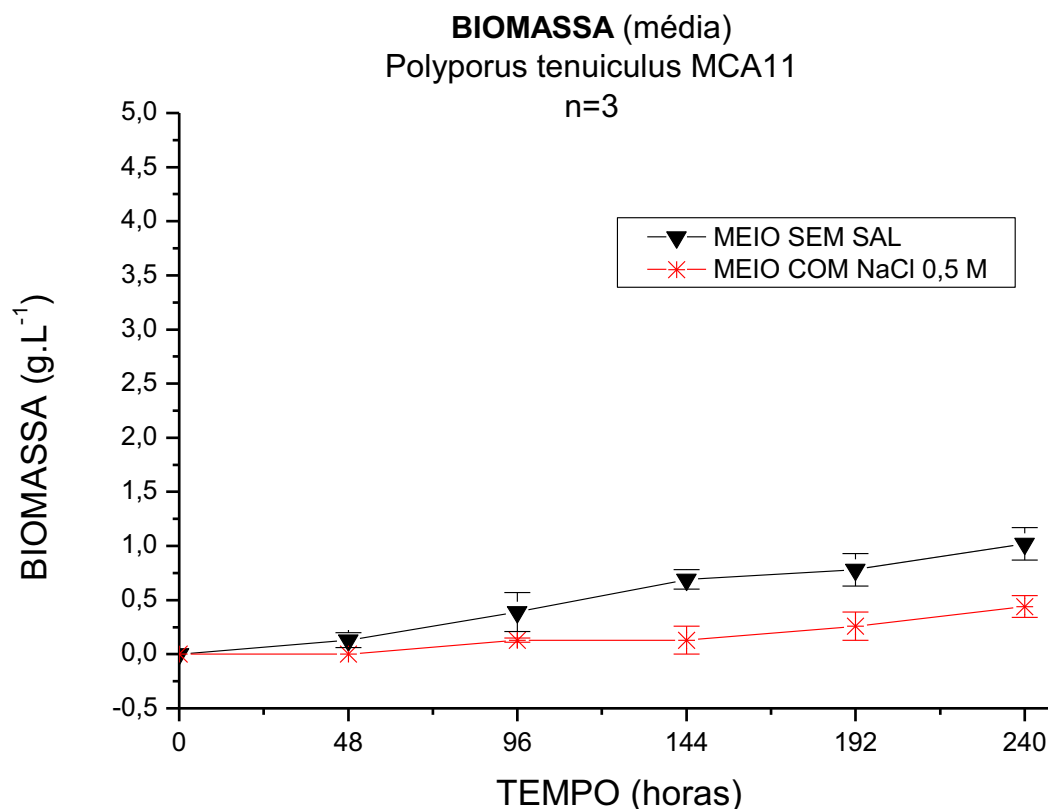


Figura 17: Curva de crescimento da linhagem *Polyporus tenuiculus* MCA11, que apresentou inibição intermediária em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

O terceiro grupo é representado pelas linhagens que tiveram maior crescimento em meio salino. O fungo que apresentou o maior estímulo do seu crescimento na presença de NaCl 0,5 M foi *Dacryponax elegans* SXS323 (fig. 18), crescendo 28,24% mais nesse meio (biomassa de 1,09 g . L⁻¹) do que o observado no meio sem sal (biomassa de 0,85 g . L⁻¹) em 240 horas (tab. 2). Do mesmo modo, a linhagem *Polyporus sp* MCA128 (fig. 19) também cresceu melhor no meio salino. Ela apresentou 10,29% de estimulação do crescimento, com biomassas de 2,72 g . L⁻¹ e 3,00 g . L⁻¹, nos meio com ausência e presença de NaCl, respectivamente (tab. 2). Outro fungo que registrou melhor crescimento micelial em meio salino foi *Datronia stereoides* MCA167 (fig. 20), com 23,54% de estímulo e biomassa de 2,63 g . L⁻¹ (em meio sem sal) e de 3,25 g . L⁻¹ (em meio com NaCl) (tab. 2).

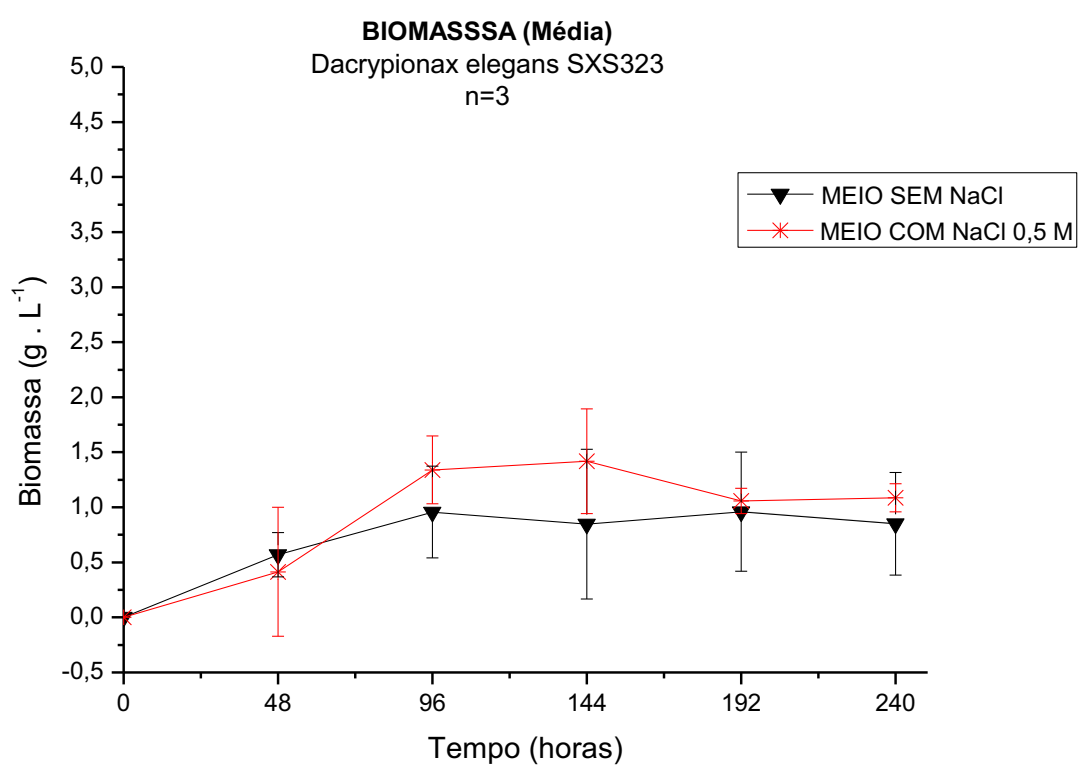


Figura 18: Curva de crescimento da linhagem *Dacryopinax elegans* SXS323, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

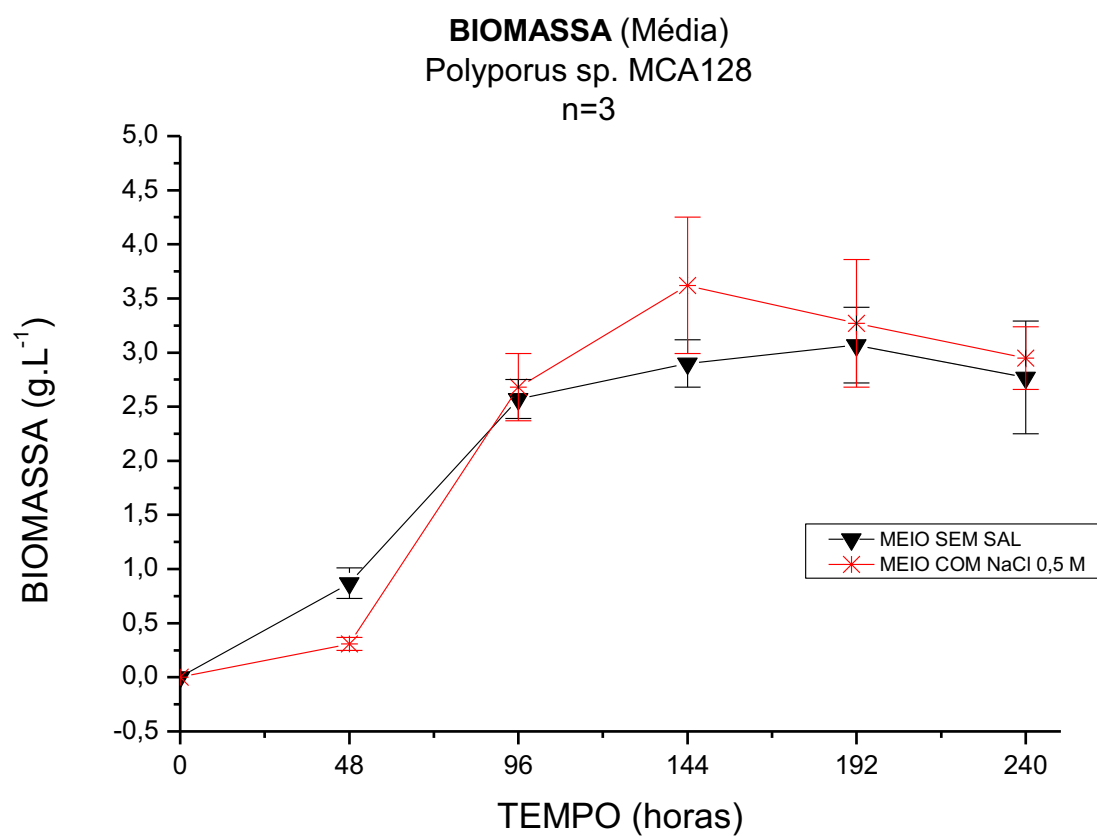


Figura 19: Curva de crescimento da linhagem *Polyporus sp* MCA128, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

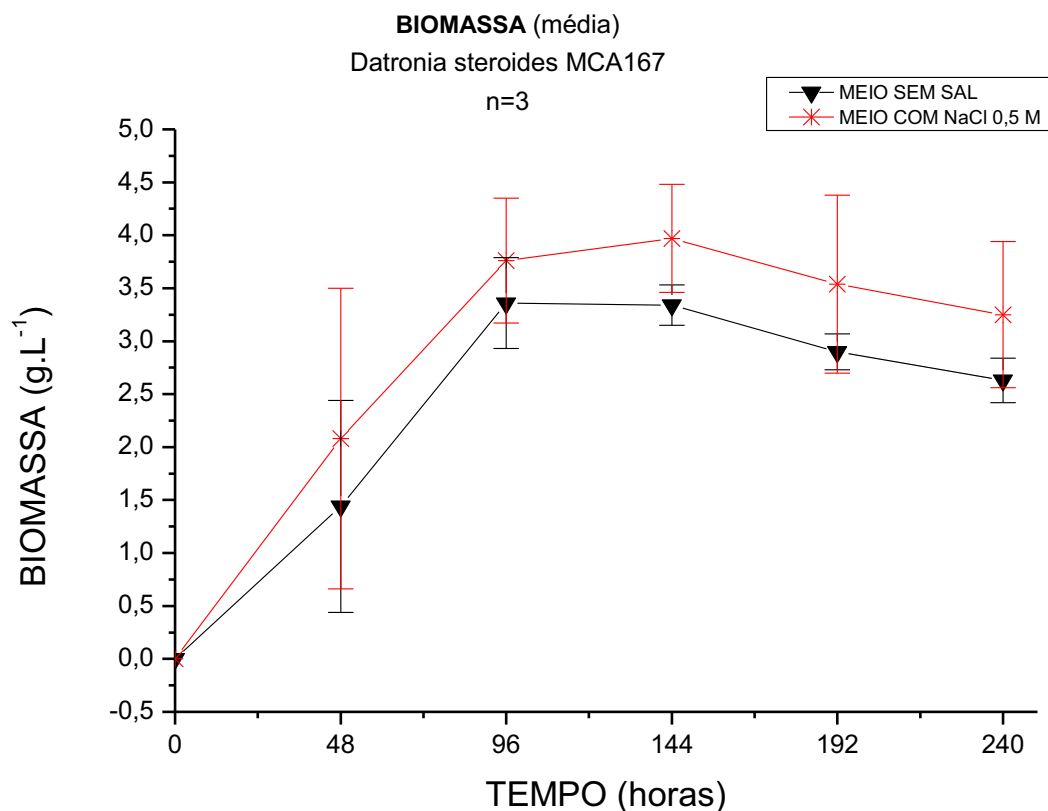


Figura 20: Curva de crescimento da linhagem *Datronia stereoides* MCA167, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido com NaCl 0,5 M levemente agitado, comparando seu crescimento em meio sem sal.

5.2 Crescimento micelial em meio líquido levemente agitado contendo 0,6 M ou 0,8 M de NaCl

Com o objetivo de verificar o efeito do aumento da concentração salina sobre o crescimento micelial, cinco das linhagens estudadas tiveram seu crescimento analisado em meio líquido levemente agitado (40 rpm) acrescido de 0,6 M ou 0,8 M de NaCl. Esse experimento incluiu as linhagens que tiveram seu crescimento estimulado em meio com 0,5 M de sal (*D. elegans* SXS323, *Polyporus* sp MCA128 e *Datronia estereoides* MCA167), uma das linhagens com forte inibição (*G. striatum* MCA2) e outra com inibição intermediária (*P. sanguineus* MCA16).

D. elegans SXS323 (fig 21) apresentou seu maior crescimento em meio com NaCl 0,6 M. Esse crescimento foi observado no tempo de 144 horas, apresentando uma biomassa de $1,50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O valor de biomassa no tempo correspondente no meio sem sal foi de $0,85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Contudo, no meio com NaCl 0,8 M, a maior porcentagem de estimulação (23,53%) e biomassa ($1,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) foram registradas no tempo de 240 horas e foram semelhantes às observadas no meio sem sal (tab. 3).

Tabela 3: Biomassa média do fungo *Dacrypionax elegans* SXS323 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3

	MEIO SEM NaCl	MEIO COM NaCl 0,5 M		MEIO COM NaCl 0,6 M		MEIO COM NaCl 0,8 M	
TEMPO (h)	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*
48	0,57	0,41	-28,07	0,27	-52,63	0,19	-66,67
96	0,96	1,34	+39,58	0,68	-29,17	0,54	-43,75
144	0,85	1,42	+67,06	1,50	+76,47	0,81	-4,71
192	0,96	1,06	+10,42	1,48	+54,17	1,15	+19,79
240	0,85	1,09	+28,24	1,43	+68,24	1,05	+23,53

* O sinal negativo (-) indica que houve inibição do crescimento micelial e o sinal positivo (+), estímulo do crescimento.

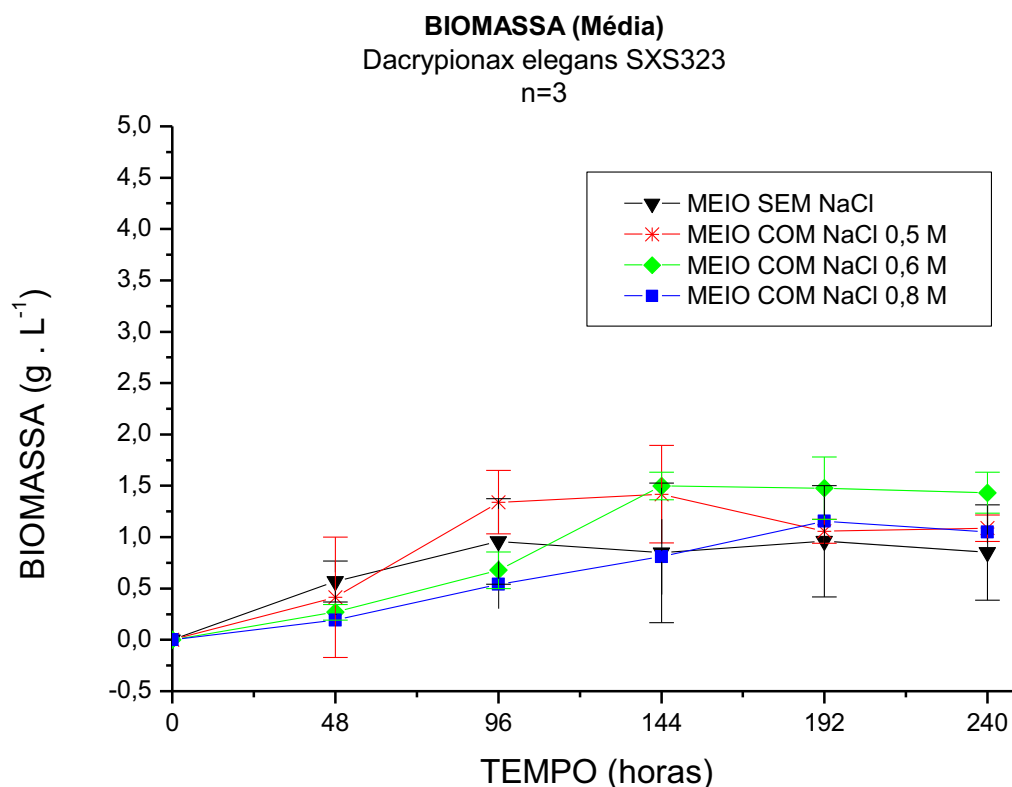


Figura 21: Curva de crescimento da linhagem *Dacrypionax elegans* SXS323, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.

Datronia stereoides MCA167 (fig. 22) manteve um crescimento maior em meio com 0,6 M e 0,8 M de sal do que em meio no qual esse soluto estava ausente. Contudo, é possível observar uma diminuição na estimulação de seu crescimento de 58,56% (no tempo de 240 horas, com 4,17 g . L⁻¹) para 15,21% (biomassa de 3,03 g . L⁻¹ em 240 horas) conforme aumentou-se a concentração salina do meio de 0,6 M para 0,8 M (tab. 4). É interessante notar que tanto *Dacrypionax elegans* SXS323 e *Datronia stereoides* MCA167 tiveram seu crescimento inibido no início desses experimentos, mas conseguiram reverter essa inibição, observando-se um estímulo de seu crescimento ao final.

Tabela 4: Biomassa média do fungo *Datronia stereoides* MCA167 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3

	MEIO SEM NaCl	MEIO COM NaCl 0,5 M		MEIO COM NaCl 0,6 M		MEIO COM NaCl 0,8 M	
TEMPO (h)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*
48	1,44	2,08	+44,44	0,23	-84,03	0,24	-83,33
96	3,36	3,76	+11,90	2,45	-27,08	1,75	-47,92
144	3,34	3,97	+18,86	3,11	-6,89	2,72	-18,56
192	2,90	3,54	+22,07	3,49	+20,34	3,34	+15,17
240	2,63	3,25	+23,57	4,17	+58,56	3,03	+15,21

* O sinal negativo (-) indica que houve inibição do crescimento micelial e o sinal positivo (+), estímulo do crescimento.

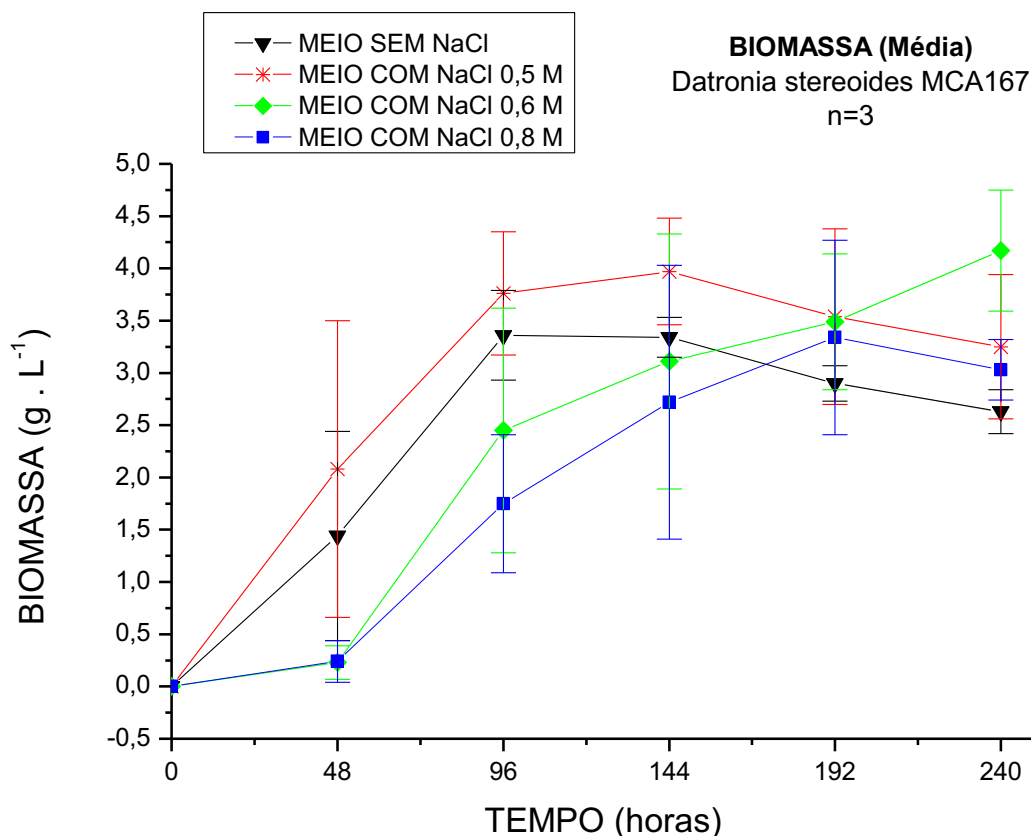


Figura 22: Curva de crescimento da linhagem *Datronia stereoides* MCA167, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.

Polyporus sp MCA128 (fig. 23) apresentou um decréscimo de inibição no decorrer do ensaio tanto no meio com 0,6 M como no meio com 0,8 M de NaCl. Essa inibição, no meio com 0,6 M de sal, atingiu sua máxima de 48,86% ($0,45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) em 48 horas e mínima de 1,10% ($2,69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) em 240 horas. Já no meio com 0,8 M de sal, essa variação de inibição foi de 64,77% (48 horas, $0,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) para 0,37% (240 horas, $2,71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). *Polyporus sp* MCA128 foi sensível às maiores concentrações salinas, apresentando maior inibição de seu crescimento quando comparado com as outras duas linhagens que tiveram um bom crescimento em meio salino. Contudo, da mesma forma que essas linhagens, *Polyporus sp* MCA128 também conseguiu diminuir o efeito inibitório da salinidade (tab. 5).

Tabela 5: Biomassa média do fungo *Polyporus sp* MCA128 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3

	MEIO SEM NaCl	MEIO COM NaCl 0,5 M		MEIO COM NaCl 0,6 M		MEIO COM NaCl 0,8 M	
TEMPO (h)	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	INIBIÇÃO/ESTÍMULO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*
48	0,88	0,34	-61,36	0,45	-48,86	0,31	-64,77
96	2,58	2,72	+5,43	1,69	-34,50	1,81	-29,84
144	2,92	3,66	+25,34	2,92	0,00	2,82	-3,42
192	2,93	3,31	+12,97	2,77	-5,46	2,75	-6,14
240	2,72	3,00	+10,29	2,69	-1,10	2,71	-0,37

* O sinal negativo (-) indica que houve inibição do crescimento micelial e o sinal positivo (+), estímulo do crescimento.

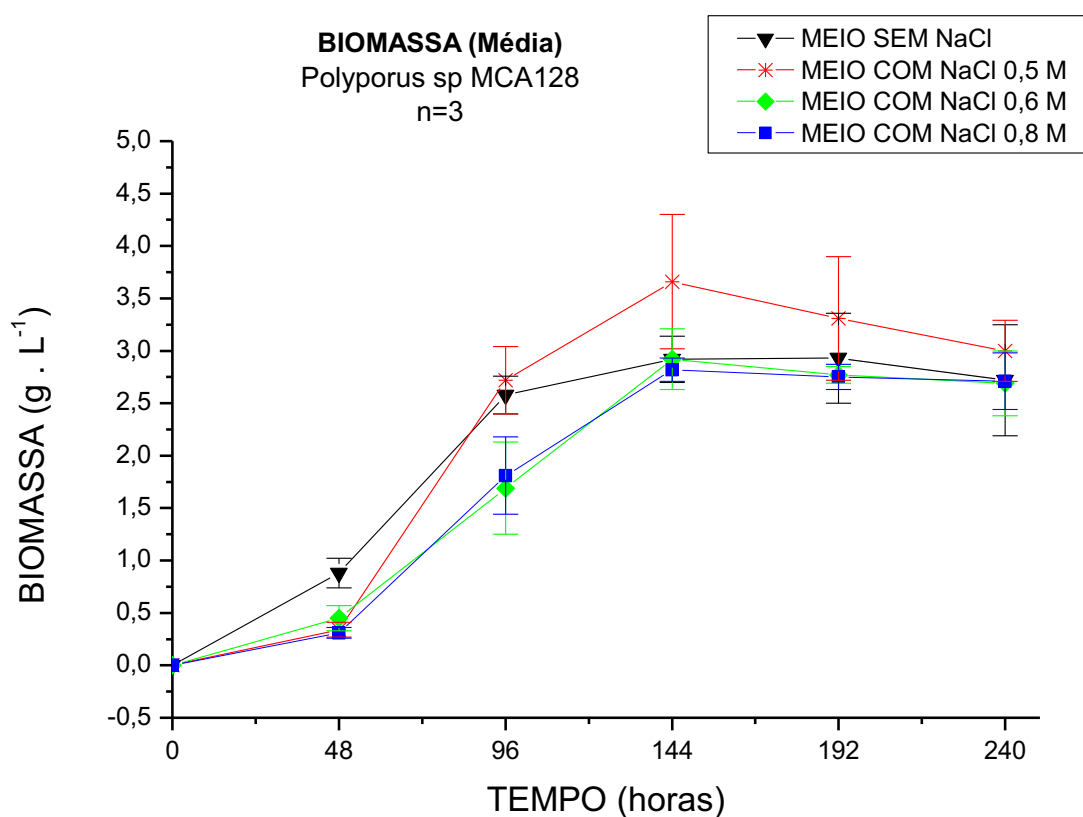


Figura 23: Curva de crescimento da linhagem *Polyporus sp* MCA128, que apresentou estímulo do crescimento em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.

P. sanguineus MCA16 teve um aumento de inibição do crescimento micelial quando a concentração salina do meio foi aumentada. Esse fungo apresentou inibição intermediária em meio com 3% de sal e passou a verificar-se inibições semelhantes aos fungos fortemente inibidos, 89,64% (biomassa de 0,23 g · L⁻¹) e 92,34% (0,17 g · L⁻¹), respectivamente para os meios com 0,6 M e 0,8 M de NaCl, no tempo de 240 horas (fig. 24, tab.6).

Tabela 6: Biomassa média do fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA16 produzida em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição ou estímulo do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3

	MEIO SEM NaCl	MEIO COM NaCl 0,5 M		MEIO COM NaCl 0,6 M		MEIO COM NaCl 0,8 M	
TEMPO (h)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO/ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*
48	0,04	0,00	-100,00	0,08	+100,00	0,07	+75,00
96	0,62	0,16	-74,19	0,04	-93,55	0,05	-91,94
144	1,33	0,18	-86,47	0,11	-91,73	0,15	-88,72
192	1,94	0,43	-77,84	0,29	-85,05	0,20	-89,69
240	2,22	0,56	-74,77	0,23	-89,64	0,17	-92,34

* O sinal negativo (-) indica que houve inibição do crescimento micelial e o sinal positivo (+), estímulo do crescimento.

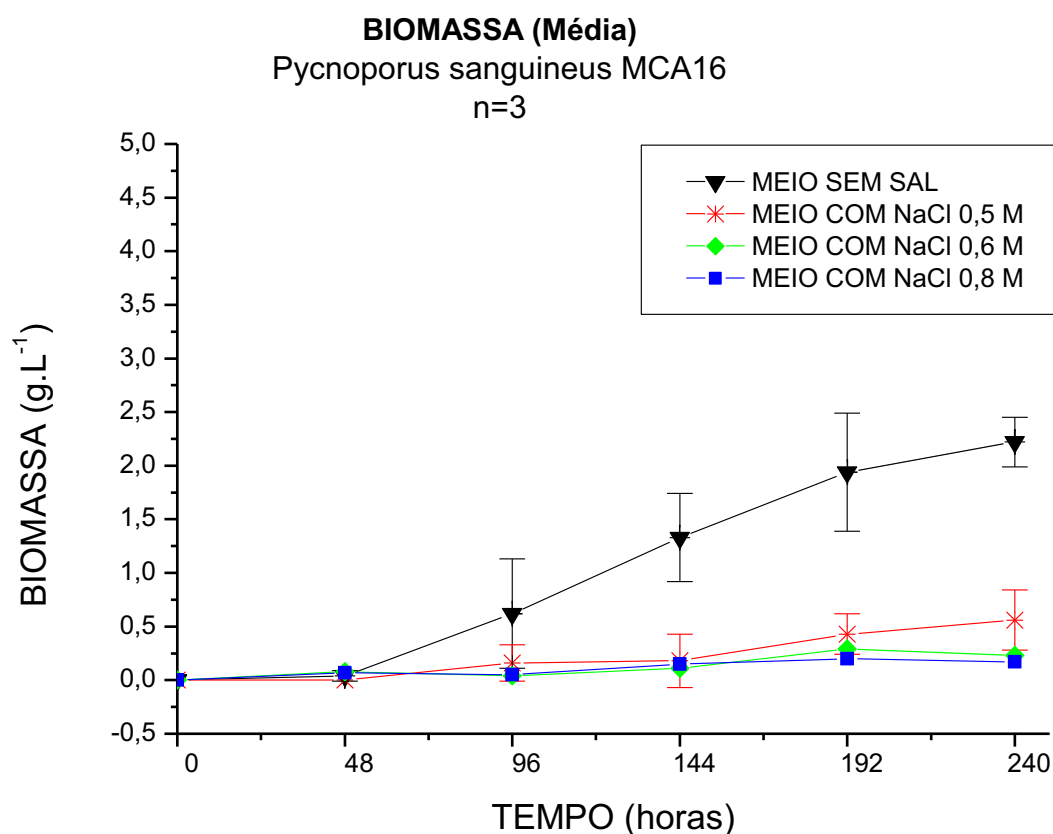


Figura 24: Curva de crescimento da linhagem *Pycnoporus sanguineus* MCA16, que apresentou inibição intermediária em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.

Por outro lado, *G. striatum* MCA2, que foi fortemente inibido em meio com 0,5 M de sal, registrou uma inibição média menor (74,86%; biomassa de 0,45 g . L⁻¹) em meio com 0,6 M de sal e voltou a apresentar uma inibição semelhante à do meio com 0,5 M de sal quando inoculado em meio com concentração salina de 0,8 M (87,15%, com biomassa de 0,23 g . L⁻¹), também observado no tempo de 240 horas (fig. 25, tab. 7).

Tabela 7: Biomassa média do fungo *Gloeophyllum striatum* MCA2 fermentado em meio sem sal, com 0,5 M, 0,6 M ou 0,8 M de NaCl e inibição do seu crescimento nessas concentrações salinas. n=3

	MEIO SEM NaCl	MEIO COM NaCl 0,5M		MEIO COM NaCl 0,6M		MEIO COM NaCl 0,8M	
TEMPO (h)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*	BIOMASSA MÉDIA (g . L ⁻¹)	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO (%)*
48	0,07	0,00	-100,00	0,12	+71,43	0,07	0,00
96	0,31	0,05	-83,87	0,10	-67,74	0,09	-70,97
144	0,77	0,11	-85,71	0,12	-84,42	0,09	-88,31
192	1,26	0,26	-79,37	0,21	-83,33	0,18	-85,71
240	1,79	0,25	-86,03	0,45	-74,86	0,23	-87,15

* O sinal negativo (-) indica que houve inibição do crescimento micelial e o sinal positivo (+), estímulo do crescimento.

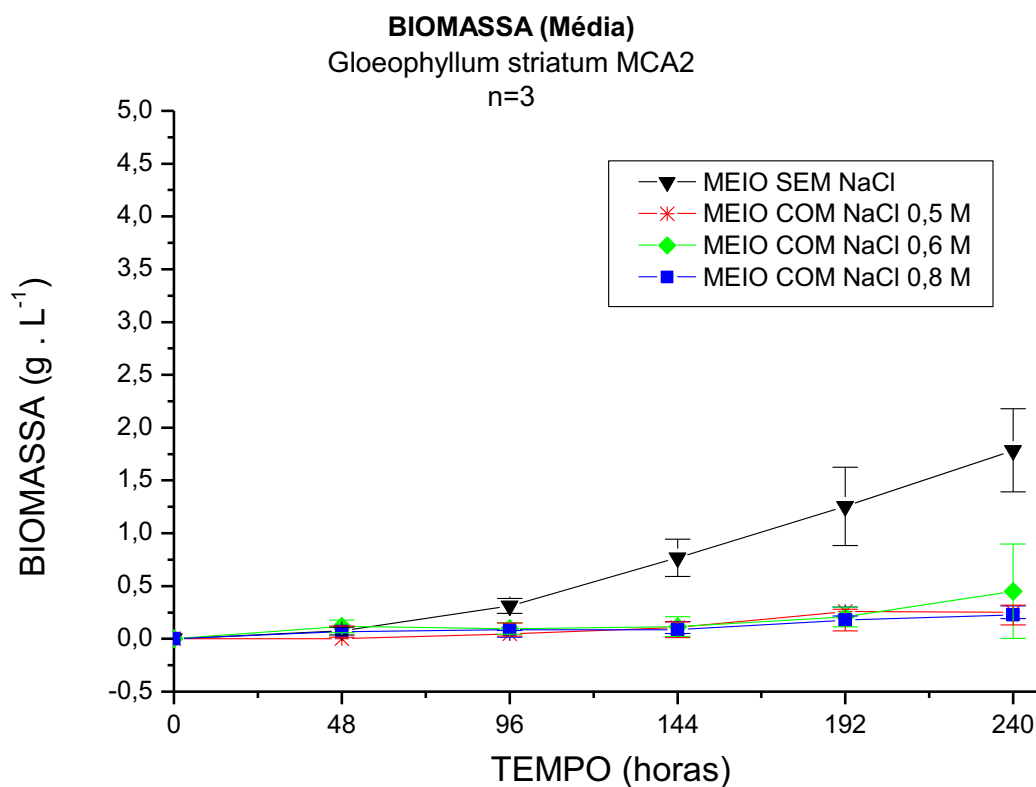


Figura 25: Curva de crescimento da linhagem *Gloeophyllum striatum* MCA2, que apresentou forte inibição em meio líquido levemente agitado com NaCl 0,5 M, comparando seu crescimento em meio sem sal ou com 0,6 M e 0,8 M de sal.

5.3 Crescimento micelial de *Dacryopinax elegans* SXS323 em diferentes condições de cultivo

O basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 foi capaz de crescer em todas as condições testadas (tab.8). Nos ensaios sem diurom, a fonte de carbono fornecida ao fungo foi glicose 5,0 g . L⁻¹. Na situação controle, o crescimento máximo atingido foi de 3,052 g . L⁻¹, após 96 horas de cultivo, caracterizando a fase de crescimento exponencial do fungo. A partir desse ponto, foi possível notar uma estabilização na taxa de crescimento, com tendência de queda da produção de biomassa, indicando a fase de crescimento estacionário, seguida da fase de declínio.

Tabela 8: Produção média de biomassa do basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 em meio com glicose 5,0 g .L⁻¹ como fonte de carbono e cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M, mostrando se houve estímulo (+) ou inibição(-) do crescimento. (média±desvio padrão). N=2

	CONTROLE (Glicose 5,0 g . L ⁻¹)	CLORETO DE SÓDIO 0,5 M (Glicose 5,0g . L ⁻¹)		MANITOL 0,5 M (Glicose 5,0g . L ⁻¹)		GLICEROL 0,5 M (Glicose 5,0g . L ⁻¹)	
TEMPO (horas)	Biomassa (g . L ⁻¹)	Biomassa (g . L ⁻¹)	Inibição/ estímulo do crescimento (%)*	Biomassa (g . L ⁻¹)	Inibição/ estímulo do crescimento (%)*	Biomassa (g . L ⁻¹)	Inibição/ estímulo do crescimento (%)*
0	0	0	0	0	0	0	0
48	1,41±0,088	0,538±0,478	-61,84	1,792±0,011	+27,09	1,264±0,153	-10,35
96	3,052±0,843	1,194±0,840	-60,88	3,620±0,560	+18,61	3,378±0,704	+10,68
144	2,764±0,436	1,818±1,723	-34,23	4,798±1,270	+73,59	3,746±0,291	+35,53
192	2,554±0,246	1,718±1,298	-32,73	6,986±1,112	+173,53	5,368±0,277	+110,18
240	2,152±0,475	1,292±0,922	-39,96	6,406±1,202	+197,68	6,158±1,734	+186,15

Em meio com cloreto de sódio 0,5 M, o crescimento atingiu seu máximo após 144 horas, obtendo-se uma biomassa de 1,818 g . L⁻¹. Nos tempos seguintes, observou-se o início do declínio do crescimento. O crescimento micelial nessa condição foi inibido em relação ao controle. A inibição máxima foi atingida nas primeiras 48 horas do experimento, verificando-se 61,84% de inibição na produção de biomassa. No decorrer do ensaio observou-se a diminuição da inibição do crescimento, observando-se 32,73% de inibição (tab 8). Entretanto, esses resultados contradizem os que foram apresentados anteriormente, nos itens 5.1 e 5.2.

Os meios enriquecidos com manitol 0,5 M e glicerol 0,5 M foram os que apresentaram o melhor crescimento. Quando o soluto utilizado para diminuir a atividade de água do meio foi o manitol, averiguou-se que com 192 horas, *Dacryopinax elegans* SXS323 atingiu seu crescimento máximo (6,986 g . L⁻¹). Entretanto, o estímulo máximo foi registrado com 240 horas quando alcançou o patamar de 197,68% (tab 8).

Do mesmo modo, a adição de glicerol no meio de cultura estimulou o crescimento micelial, verificando-se no tempo de 240 horas um estímulo de 186,15%, quando comparado com o controle. Nessa condição, não se foi possível perceber indícios de um início da fase de

crescimento estacionário embora o crescimento fúngico tenha desacelerado após 192h (tab. 8).

As mesmas condições anteriores foram testadas com a adição de diurom 10,0 mg . L⁻¹ ao meio de cultura, sendo esta a única fonte de carbono fornecida ao fungo (tab. 9). No ensaio em que nenhum soluto foi adicionado para diminuir a atividade de água, o crescimento dessa linhagem atingiu seu ponto máximo com 96 horas (1,798 g . L⁻¹).

Tabela 9: Biomassa média do basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 em meio com diurom 10 mg . L⁻¹ e com cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M, mostrando o estímulo (+) ou inibição do crescimento (-) nos tratamentos estudados. (média±desvio padrão). n=2

	DIUROM 10 mg . L ⁻¹	CLORETO DE SÓDIO 0,5 M		MANITOL 0,5 M		GLICEROL 0,5 M	
TEMPO (horas)	Biomassa (g . L ⁻¹)	Biomassa (g . L ⁻¹)	Inibição/ estímulo do crescimento (%)*	Biomassa (g . L ⁻¹)	Inibição/ estímulo do crescimento (%)	Biomassa (g . L ⁻¹)	Inibição/ estímulo do crescimento (%)*
0	0	0	0	0	0	0	0
48	0,856±0,311	0,288±0,226	-66,36	1,220±0,311	+42,52	1,064±0,091	+24,30
96	1,798±1,649	0,574±0,071	-68,08	3,942±1,360	+119,24	3,516±1,120	+95,55
144	1,436±0,673	0,738±0,054	-48,61	4,258±0,704	+196,52	4,684±1,629	+226,18
192	1,438±0,727	0,596±0,192	-58,55	5,840±0,526	+306,12	4,416±0,243	+207,09
240	1,340±0,781	0,386±0,195	-71,19	7,240±0,916	+440,30	4,166±0,235	+210,90

Os dados da Tabela 9 mostram que o fungo foi capaz de utilizar diurom como única fonte de carbono para sustentar seu crescimento. Quando foi adicionado cloreto de sódio 0,5M ao meio com diurom, observou-se a inibição do crescimento fúngico. Tal inibição atingiu seu cume com 240 horas de cultivo, chegando à marca de 71,19% de inibição. Além disso, o crescimento máximo do fungo foi observado com 144 horas, registrando-se 0,738 g . L⁻¹ de biomassa. Este, também foi o ponto que se teve a menor inibição do crescimento (48,61%) (tab. 9).

A adição de manitol 0,5 M ao meio com diurom estimulou o crescimento do fungo, em relação ao meio que continha somente o herbicida. É possível perceber um

crecente estímulo do crescimento, culminando com o valor de 440,30% após 240 horas de cultivo. Esse ponto coincidiu com a maior produção de biomassa micelial, $7,240 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Nesse ensaio, foi observada somente uma fase de crescimento, não sendo possível determinar uma proeminente fase de crescimento exponencial ou estacionário (tab. 9).

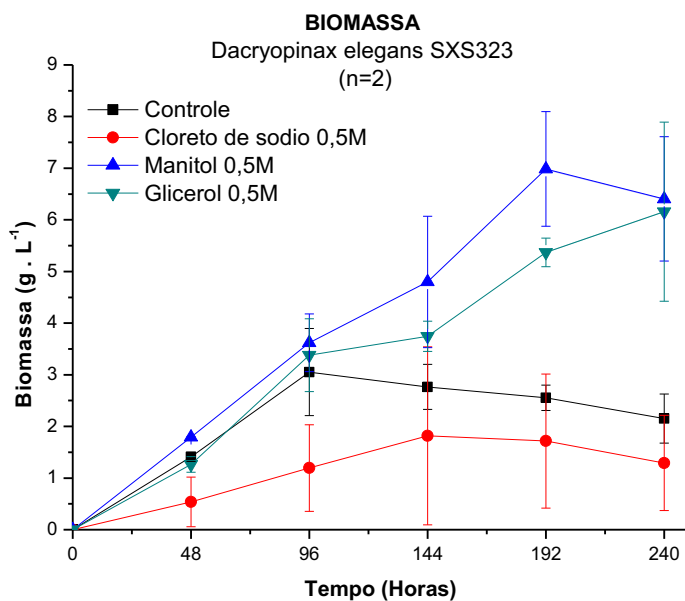
Em meio contendo glicerol 0,5 M também pode-se verificar um aumento na produção de biomassa comparado com meio com somente diurom como fonte de carbono. O crescimento atingiu seu auge com 144 horas, com $4,684 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (aumento de 226,18%) (tab. 9).

A análise dos dados da Tabela 10 e da Figura 26 permitiu constatar que a substituição da glicose pelo diurom como fonte de carbono provocou uma redução do crescimento fúngico. No meio com cloreto de sódio observou-se inibição na produção de biomassa quando a glicose foi substituída pelo diurom como fonte de carbono. Essa inibição foi acentuada pelo NaCl e amenizada por glicerol e manitol. Observa-se que, em presença de glicerol chegou a haver estímulo do crescimento nas primeiras horas do cultivo.

Tabela 10: Estímulo (+) ou inibição (-) do crescimento micelial em presença de diurom, considerando a produção de biomassa em meio com glicose como referência.

TEMPO (h)	SEM ADIÇÃO SOLUTO	CLORETO DE SÓDIO 0,5 M	MANITOL 0,5 M	GLICEROL 0,5 M
0	0	0	0	0
48	-39,29	-46,47	-31,92	-15,82
96	-41,09	-51,92	+8,90	+4,09
144	-48,05	-59,41	-11,25	+25,04
192	-43,70	-65,31	-16,40	-17,73
240	-37,73	-70,12	+13,02	-32,35

a)



b)

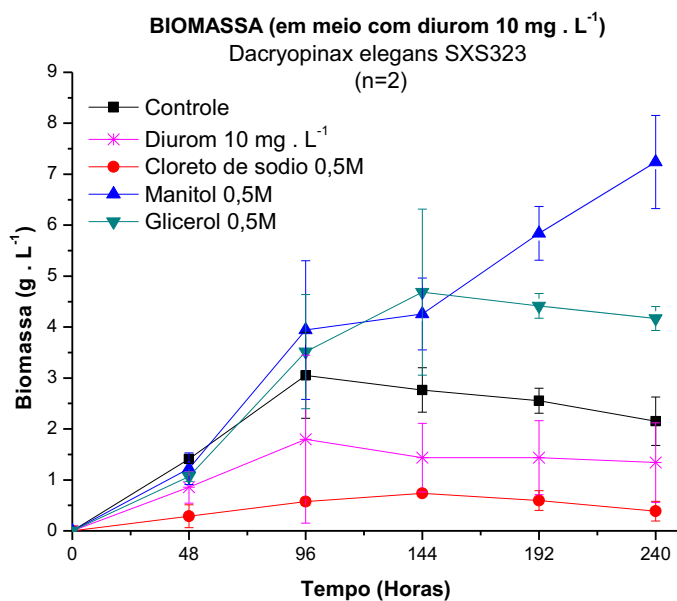


Figura 26: Biomassa micelial. **A)** Curvas de crescimento de *D. elegans* SXS323 em meio com glicose 5,0 g . L⁻¹, acrescido ou não de cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M. **B)** Curvas de crescimento de *D. elegans* SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L⁻¹, podendo ou não conter cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M ou glicerol 0,5 M.

5.4 CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES

Para a dosagem de açúcar redutor foi utilizado o método de Somogy-Nelson. Esse teste apresentou reação positiva somente nos ensaios nos quais glicose foi a fonte de carbono. Nos testes com amostras com diurom como única fonte de carbono não foi detectada a presença de compostos redutores. As amostras de padrões puros de manitol e glicerol apresentaram reação negativa a esse método.

A análise das curvas de consumo de compostos redutores mostra que no controle, no meio com manitol e no meio com glicerol, essa linhagem foi capaz de consumir toda a glicose existente em 96 horas de cultivo. Para o meio com cloreto de sódio, a depleção de glicose ocorreu com 144 horas (fig. 27).

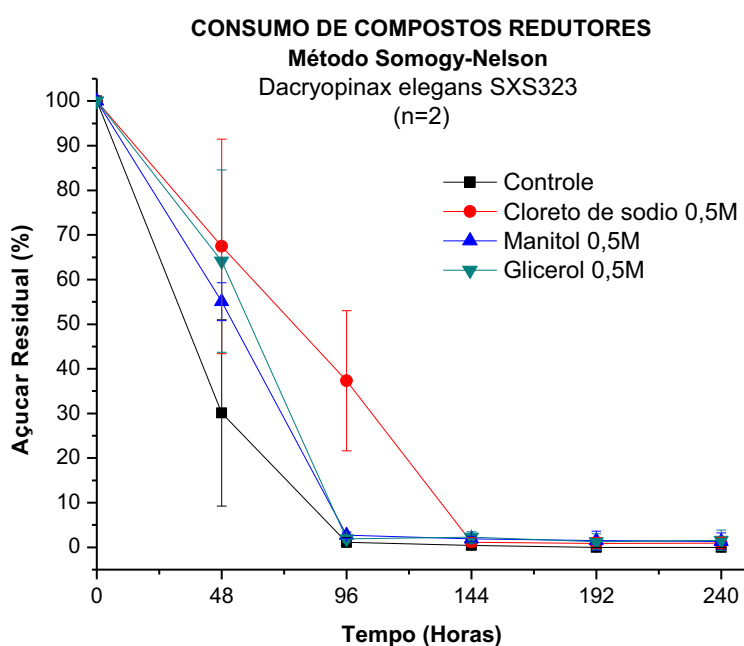


Figura 27: Curvas de consumo de compostos redutores em meio com glicose podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol.

Quando se compara a produção de biomassa com o consumo de compostos redutores, verifica-se que houve uma correlação direta entre esses dois parâmetros. O açúcar

disponível para o fungo esgota-se com 96 horas de cultivo, esse também é o momento que se verifica seu crescimento máximo. A partir desse momento a curva de crescimento começa a declinar, indicando o início da fase de morte do crescimento micelial. Esse fato pode ser causado por um déficit nutricional, como a depleção de carbono (fig 28).

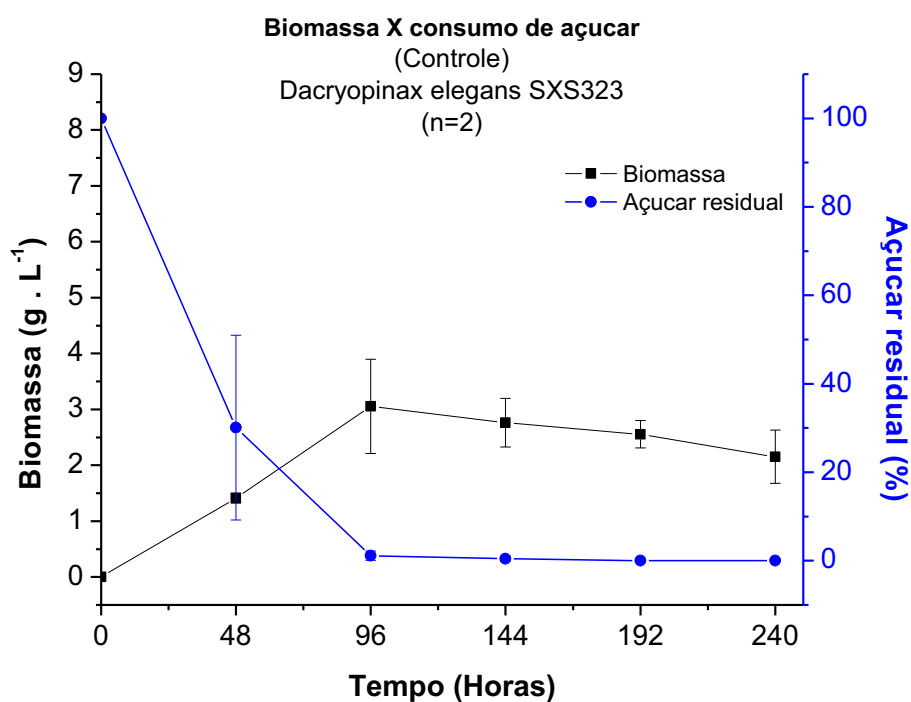


Figura 28: Curvas de crescimento e de consumo de compostos redutores em meio contendo glicose.

Essa correlação também foi observada quando o meio foi enriquecido com cloreto de sódio. Nesse caso, a glicose esgotou-se após 144 horas. Assim, como na situação relatada acima, após o crescimento fúngico ter atingido o seu máximo, coincidindo com a exaustão de glicose, observou-se o início da fase de declínio (fig.29).

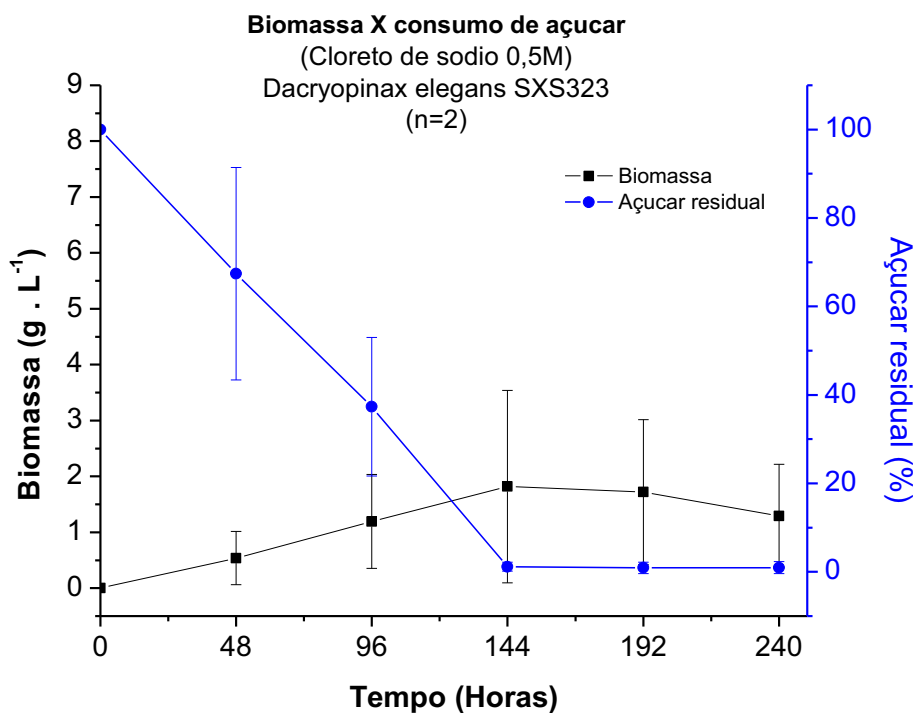


Figura 29: Curva de crescimento e de consumo de compostos redutores em meio contendo glicose e cloreto de sódio.

Diferentemente dos dois comportamentos citados acima, não foi verificada a correlação entre produção de biomassa e consumo de açúcar em meios com manitol e glicerol. Quando o manitol foi adicionado ao meio, observou-se que o açúcar esgotou-se, porém, o crescimento fúngico é ascendente até atingir o tempo de 192 horas, quando surge uma tendência de estabilização da curva (fig. 30).

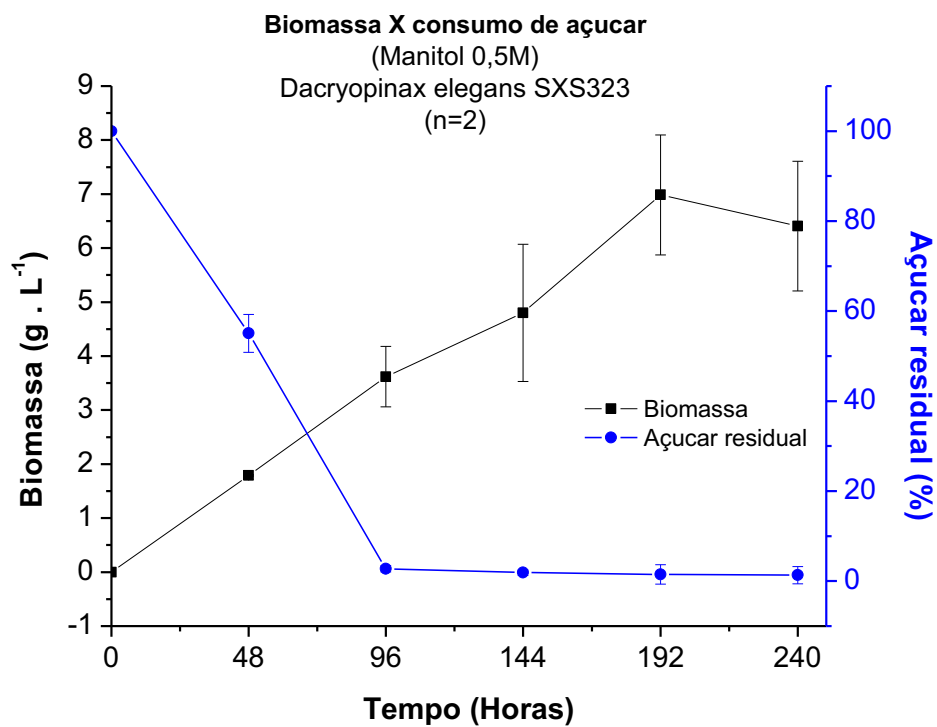


Figura 30: Curva de crescimento e de consumo de composto redutor do fungo *Dacryopinax elegans* SXS323 em meio contendo glicose e manitol.

Do mesmo modo, no meio enriquecido com glicerol, o crescimento micelial continuou mesmo depois após o consumo total de glicose. Nessa condição, a curva manteve-se ascendente no período do experimento (fig 31).

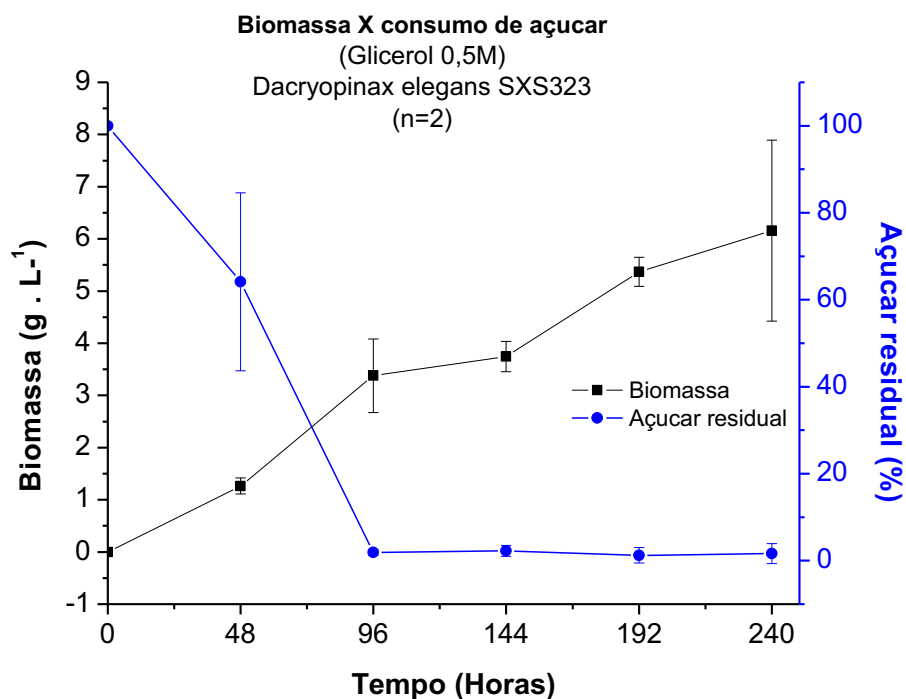


Figura 31: Curva de crescimento e curva de consumo de composto redutor do basidiomiceto *D. elegans* SXS323 em meio com glicose e glicerol.

Esses dados indicam que, após a exaustão da glicose do meio, o fungo foi capaz de utilizar o manitol e o glicerol como fontes de carbono. Esses dados corroboram com o estímulo ao crescimento micelial observado na presença desses compostos.

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.5.1 Lacase

O basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 teve valores de atividade muito baixos de lacase em 240 horas de fermentação (tab. 11). Não houve detecção da enzima pela metodologia adotada no ensaio controle e em meio com cloreto de sódio 0,5 M. O meio enriquecido com manitol 0,5 M teve seu pico de atividade com 3,94 U · L⁻¹ em 240 horas. Do

mesmo modo, o meio com adição de glicerol apresentou atividade de lacase de $3,67 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$. Elisashvili e outros (2009) observaram que o fungo *Cerrena unicolor* apresentou atividade de lacase de $15000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$. Já o meio com glicerol $0,5 \text{ M}$ durante o experimento teve seu pico com 144 horas, apresentando atividade enzimática de $3,67 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$. Esse valores de atividade estão bem abaixo dos relatados na literatura. Contudo, observou-se durante as dosagens que nos tempos de maior atividade (144 e 192 horas, em meio com glicerol, por exemplo), um aumento da coloração esverdeada do meio reacional, típica da verificada quando há presença de lacase. Essa coloração se intensifica quando se aumenta o tempo de reação. Esse fato não foi averiguado no tubo controle e nem no branco da reação. Isso indica que embora numa concentração muito baixa, há indícios da enzima no extrato enzimático bruto. É possível que se verificasse valores maiores de atividade enzimática caso se estendesse o experimento por mais alguns dias.

Tabela 11: Atividade de lacase em meio com glicose $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (Média±Desvio Padrão), $n=2$

TEMPO (h)	CONTROLE ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	CLORETO DE SÓDIO $0,5 \text{ M}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	MANITOL $0,5 \text{ M}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	GLICEROL $0,5 \text{ M}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	ND	ND	ND	ND
48	ND	ND	ND	ND
96	$1,02 \pm 0,5$	$0,20 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,0$	$1,56 \pm 0,0$
144	$1,20 \pm 0,17$	$0,18 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,17$	$3,67 \pm 0,07$
192	$0,32 \pm 0,04$	ND	$2,02 \pm 0,07$	$2,66 \pm 0,25$
240	$0,40 \pm 0,06$	ND	$3,94 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,09$

ND=não detectada

Em meio com diurom, os resultados de atividade enzimática foram semelhantes aos observados nos meios com glicose $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, como fonte de carbono. A metodologia adotada também detectou valores muito baixos de atividade nas condições em que o meio continha somente diurom e no meio com cloreto de sódio $0,5 \text{ M}$ (tab 12). No período do experimento, o pico de produção enzimática ocorreu com 192 horas no meio com manitol,

registrando-se atividade de $6,20 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$. Do mesmo modo, o meio com glicerol apresentou pico de atividade com 192 horas de cultivo, apurando-se o valor de $5,20 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ para a atividade enzimática. Nas dosagens dos extratos contendo diurom no meio também verificou-se a intensificação da coloração verde no tubo de ensaio. Os resultados numéricos das atividades com manitol e glicerol foram maiores que no meio sem o herbicida, indicando que o diurom pode agir como indutor da atividade de lacase.

Tabela 12: Atividade de lacase do basidiomiceto *D. elegans* SXS323 em meio com diurom $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média $\pm$ desvio padrão), n=2

TEMPO (Horas)	DIUROM $10,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	CLORETO DE SÓDIO $0,5 \text{ M}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	MANITOL $0,5 \text{ M}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	GLICEROL $0,5 \text{ M}$ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	ND	ND	ND	ND
48	$0,39 \pm 0,1$	ND	ND	$0,92 \pm 0,1$
96	ND	$1,17 \pm 0,1$	$1,90 \pm 0,0$	$2,32 \pm 0,1$
144	$2,16 \pm 0,31$	ND	$2,08 \pm 0,21$	$4,04 \pm 0,11$
192	$0,18 \pm 0,03$	ND	$6,20 \pm 0,76$	$5,20 \pm 0,3$
240	ND	ND	ND	$3,07 \pm 0,19$

ND=não detectada

5.5.2 Manganês Peroxidase

Os valores de atividade de manganês peroxidase foram muito baixos (tab. 13). Ao contrário do que foi observado nos testes de lacase, com MnP não é possível inferir se há uma baixa concentração de enzima, pois como sua detecção é percebida na faixa da radiação ultravioleta, e assim, a reação não é perceptível ao olho humano. O maior valor de atividade registrado nas dosagens dos meios com glicose como fonte de carbono foi com glicerol $0,5 \text{ M}$, que teve atividade enzimática de $10,61 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ em 144 horas de cultivo. O meio com manitol apresentou atividade de MnP de $3,02 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, com 192 horas de cultivo. O fungo *C. unicolor* também foi capaz de produzir MnP em meio contendo manitol, apresentando uma atividade de $2000 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

Tabela 13: Atividade de manganês peroxidase do basidiomiceto *D. elegans* SXS323 em meio com glicose 5,0 g . L⁻¹, podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2

TEMPO (Horas)	CONTROLE (U . L ⁻¹)	CLORETO DE SÓDIO 0,5M (U . L ⁻¹)	MANITOL 0,5M (U . L ⁻¹)	GLICEROL 0,5M (U . L ⁻¹)
0	ND	ND	ND	ND
48	1,37±0,19	1,67±0,24	0,62±0,09	0,61±0,09
96	ND	ND	0,70±0,10	ND
144	ND	ND	ND	10,61±0,1,50
192	2,29±0,32	ND	3,02±0,43	1,25±0,18
240	ND	ND	ND	ND

ND=não detectada

Na análise das atividades de MnP em meios com diurom como fonte de carbono, também observou-se valores baixos de atividade enzimática. Nesse caso, assim como no anterior é difícil inferir se há atividade. Entretanto, analisando-se as tabelas 13 e 14 é possível verificar que os valores de atividade são maiores nos meios com diurom, em cada um dos tratamentos estudados. O meio com diurom e glicerol apresentou pico de 20,87 U . L⁻¹, quase o dobro do observado no meio com glicose e glicerol (tab. 14). No meio com manitol, foi registrada uma atividade 5,81 U . L⁻¹ em 192 horas de cultivo. Elisashvili e outros (2009) observaram que alguns compostos aromáticos, como pirogalol e ácido veratrílico, eram capazes de estimular a produção de MnP.

Tabela 14: Atividade de manganês peroxidase do basidiomiceto *D. elegans* SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L⁻¹, podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2

TEMPO (h)	DIUROM 10,0 mg . L ⁻¹ (U . L ⁻¹)	CLORETO DE SÓDIO 0,5 M (U . L ⁻¹)	MANITOL 0,5 M (U . L ⁻¹)	GLICEROL 0,5 M (U . L ⁻¹)
0	ND	ND	ND	ND
48	ND	2,53±0,36	0,34±0,05	ND
96	0,83±0,12	ND	ND	ND
144	ND	ND	0,20±0,03	20,87±2,95
192	4,04±0,57	0,22±0,03	5,81±0,82	2,09±0,29
240	ND	ND	ND	ND

ND=não detectada

5.5.3 Lignina Peroxidase

Assim como nos casos da lacase e da MnP, os valores de atividade enzimática de lignina peroxidase foram baixos nos meios com glicose. Aparentemente, sob as condições estudadas, o fungo não é capaz de induzir a produção de LiP (tab. 15). A detecção da atividade também é percebida na faixa do ultra-violeta, desse modo, não foi possível perceber mudanças de coloração nos tubos de ensaios utilizados durante a dosagem, como observado na lacase. Os valores entre os tratamentos não sofreram grande variação. Esse é um indício de que não foi detectada a presença da enzima.

Tabela 15: Atividade de lignina peroxidase do basidiomiceto *D. elegans* SXS323 em meio com diurom 5,0 g . L⁻¹, podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2

TEMPO (Horas)	CONTROLE (U . L ⁻¹)	CLORETO DE SÓDIO 0,5M (U . L ⁻¹)	MANITOL 0,5M (U . L ⁻¹)	GLICEROL 0,5M (U . L ⁻¹)
0	ND	ND	ND	ND
48	2,78±0,5	3,19±0,8	3,26±0,8	2,87±0,9
96	2,44±0,12	3,12±0,0	3,51±0,5	3,55±0,3
144	2,71±0,2	3,59±0,13	3,81±0,19	4,13±0,24
192	3,91±0,7	3,84±0,13	3,47±0,4	4,04±0,17
240	3,63±0,2	3,24±0,1	4,11±0,1	3,67±0,0

ND=não detectada

Os valores de LiP nos extratos enzimáticos brutos que continham diurom também foram baixos (Tab 16). Como foi observado nos meios com glicose como fonte de carbono, a variação dos valores de atividade não sofreram variação. Ao contrário do observado com a lacase e a MnP, não observou-se variação entre os valores dos ensaios com glicose e com diurom. Esse fato reforça os indícios de que não há atividade de LiP nas condições desse estudo.

Tabela 16: Atividade de lignina peroxidase do basidiomiceto *D. elegans* SXS323 em meio com diurom 10,0 mg . L⁻¹, podendo ou não conter cloreto de sódio, manitol ou glicerol. (média±desvio padrão), n=2

TEMPO (Horas)	DIUROM 10,0 mg . L ⁻¹ (U . L ⁻¹)	CLORETO DE SÓDIO 0,5 M (U . L ⁻¹)	MANITOL 0,5 M (U . L ⁻¹)	GLICEROL 0,5 M (U . L ⁻¹)
0	ND	ND	ND	ND
48	3,47±0,1	2,38±0,3	2,61±0,12	3,17±0,16
96	3,04±0,1	3,55±0,2	3,31±0,1	3,49±0,3
144	3,84±0,3	2,82±0,7	2,51±0,3	3,99±0,07
192	3,98±0,2	2,84±0,16	4,47±0,7	3,53±0,24
240	3,06±0,2	3,65±0,5	3,03±0,0	3,49±0,1

ND=não detectada

5.6 DEGRADAÇÃO DE DIUROM

As análises de degradação de diurom por HPLC mostram que há uma diminuição da concentração do herbicida ao longo da fermentação, indicando que o basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 é capaz de degradar esse composto (fig. 32). Esses dados corroboram aqueles de produção de biomassa, nos quais, embora em menor proporção que em meio com glicose, o diurom foi capaz de sustentar o crescimento fúngico. No ensaio em que nenhum soluto foi adicionado em alta concentração, nota-se que a degradação máxima do herbicida foi de 20,51%, ocorrendo no tempo de 240 horas. No meio com cloreto de sódio a degradação máxima registrada foi de 23,21%, observada com 96 horas de cultivo. A porcentagem de consumo de diurom verificada no meio com manitol foi de 25,47% com 192 horas. E a porcentagem aferida em meio com glicerol foi de 32,63% após 192 horas de cultivo (tab 17).

Tabela 17: Taxa de degradação do herbicida diurom pelo basidiomiceto *D. elegans* SXS323 nos diferentes tratamentos estudados: controle, cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M e glicerol 0,5 M.

TEMPO (Horas)	SEM ADIÇÃO DE SOLUTOS (%)	CLORETO DE SÓDIO 0,5M (%)	MANITOL 0,5M (%)	GLICEROL 0,5M (%)
0	0	0	0	0
48	5,72±0,83	22,69±9,79	1,45±2,04	5,22±7,38
96	7,65±9,91	23,21±5,59	16,11±5,08	13,64±19,28
144	19,11±21,43	16,79±8,95	21,73±9,55	22,09±9,26
192	9,82±13,89	6,21±1,09	25,47±14,58	32,63±5,86
240	20,51±10,84	11,48±16,24	24,98±6,22	24,03±1,32

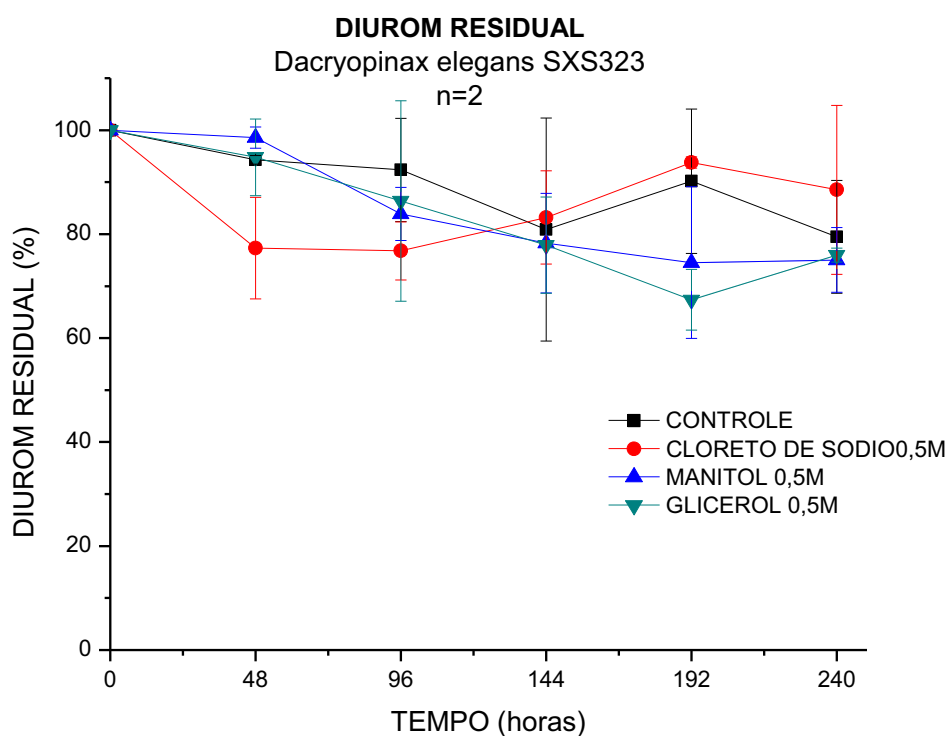


Figura 32: Curva de consumo de diurom pelo basidiomiceto *D. elegans* SXS323 nas condições controle, cloreto de sódio 0,5 M, manitol 0,5 M e glicerol 0,5 M.

Analisando-se os níveis de degradação no tempo de 240 horas, verifica-se que os meios com manitol e glicerol foram os que tiveram a maior taxa de degradação de diurom, podendo indicar que tais condições podem estimular a capacidade degradadora do basidiomiceto de alguma forma. Por outro lado, o tratamento com cloreto de sódio foi o que teve menor nível de degradação, embora possa ser observada uma taxa de degradação alta no

início da fermentação. Essa constatação, juntamente com os dados de biomassa mostrados acima (tab 8 e 9) indicam que a mistura do sal com o herbicida produzem um meio tóxico para o fungo, afetando suas funções fisiológicas.

A fim de averiguar a possibilidade de degradação do diurom por fatores físico-químicos, que poderiam mascarar os resultados, foi testada a degradação espontânea do herbicida. O meio líquido foi preparado como se fosse uma fermentação para testar a degradação do diurom, conforme descrito no item 4.9. Porém, não houve a inoculação do meio. Esse experimento foi realizado em duplicata e teve duração de 336 horas, com retiradas a cada 48 horas. A Figura 33 permite inferir que a degradação por fatores não-biológicos não exerce influência sobre os resultados obtidos, dentro do tempo de fermentação.

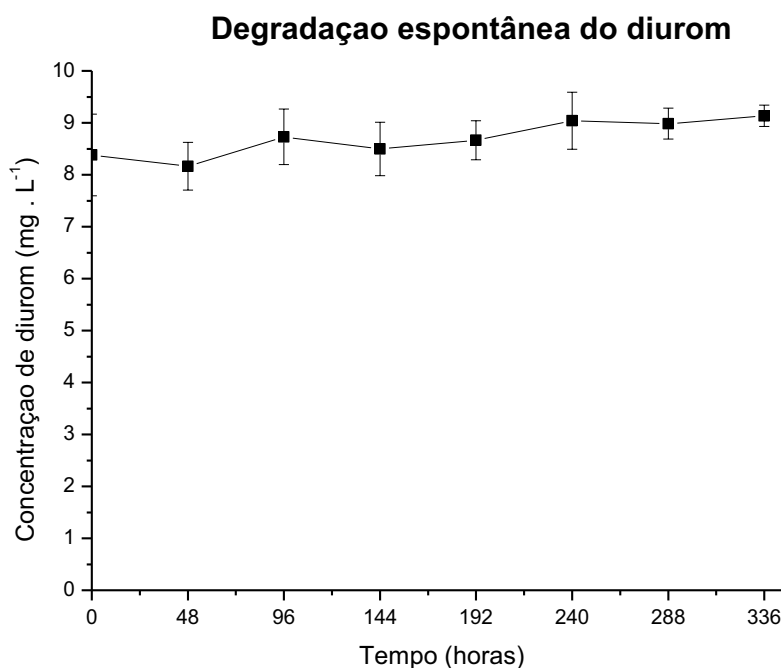


Figura 33: Curva de degradação físico-química de diurom. É possível perceber a estabilidade da curva, indicando que não há degradação espontânea do herbicida.

Os cromatogramas revelaram que nas condições testadas, o pico do diurom tem um tempo de retenção de 5,6 min (APÊNDICE). Não foi possível perceber a formação de metabólitos resultantes da degradação do herbicida. Embora nas amostras de manitol e glicerol com 240 horas seja verificado um pequeno pico com tempo de retenção de 6,5 min nos cromatogramas com diurom, indicando um possível produto de degradação, esse mesmo pico é verificado quando se analisa os cromatogramas correspondentes, mas cujo meio não foi acrescido do herbicida (figs 40 a 43). Esses resultados indicam que embora tenha havido diminuição da concentração do diurom nas amostras testadas, os produtos formados não puderam ser detectados com as condições da metodologia adotada.

6 DISCUSSÃO

São poucos os estudos publicados sobre o efeito da salinidade sobre o crescimento de basidiomicetos terrestres. A maioria dos trabalhos foi realizada com linhagens isoladas de ambientes salinos, como ambientes marinhos, mangues, pântanos salobros e salinas (MUÑOZ, 2006; LI, 2002;). Pesquisas sobre o efeito da osmolaridade sobre micorrizas também são mais comuns (BOIS, 2005; CHEN, 2001, 2003), assim como sobre o efeito da atividade de águas em fungos encontrados em produtos alimentícios.

Um estudo com basidiomicetos terrestres englobou 1.500 linhagens de 975 espécies compreendendo várias classes de fungos. Ele foi realizado por Tresner e Hayes (1971) e demonstrou que 90,3% das espécies de Basidiomycetes (162 linhagens distribuídas em 104 espécies) tiveram seu crescimento totalmente inibido em meio com mais 5% (0,8M) de NaCl. Os basidiomicetos estudados foram capazes de crescer em meios com no máximo 10% (1,7 M) de NaCl, o que representou 1,1% das espécies. Esse estudo observou que 19,2%, 13,4% e 11,5% das espécies de basidiomicetos não toleraram mais de 3% (0,5 M), 4% (0,6 M) e 5% (0,8 M) de NaCl, respectivamente. Esses resultados condizem com a inibição do crescimento da maioria das linhagens estudadas, no qual sete das dez linhagens analisadas tiveram algum tipo de inibição em meio com 0,5M de NaCl. Além disso, os fungos que cresceram melhor em meio com 0,5 M de sal, tiveram algum grau de inibição quando a concentração salina do meio foi aumentada para 0,6 M e 0,8 M.

Li e outros (2002) estudaram o crescimento de isolados coletados em regiões de mangue, na ilha de Okinawa, Japão. Eles encontraram sete isolados que cresceram em meio contendo 10% de sal marinho. O isolado identificado como um basidiomiceto pertencente ao gênero *Phlebia* não foi capaz de crescer em meio contendo 10% de sal marinho, mas seu crescimento em meio salino foi comparado com o de *Phanerochete chrysosporium*. Este

estudo mostrou que *P. chrysosporium* conseguiu se desenvolver em meio BDA contendo até 5% do composto salino, entretanto *Phlebia* sp apresentou melhor crescimento em placa de Petri contendo BDA acrescido de 0%, 3% ou 5% do composto salino.

Chen e outros (2003) analisaram a influência do estresse osmótico sobre seis isolados de fungos endófitos micorrízicos de *Woollsia pungens* e *Epacris microphylla*. Um dos solutos utilizados para a obtenção da pressão osmótica foi o cloreto de sódio. O pico de crescimento foi observado em cinco dos isolados quando submetidos a uma pressão de -1,34 MPa. Essa pressão foi criada através do acréscimo de 300 mM de NaCl ao meio de cultura. Essa concentração equivale a aproximadamente 3% do sal.

Outro estudo, realizado na ilha Laing, em Papua Nova Guiné (CASTILLO; DEMOULIN, 1997), isolou linhagens do basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, proveniente de troncos em decomposição localizados no centro da ilha, portanto, sem contato direto com a água do mar, e de troncos mortos próximos à praia, expostos a *sprays* da água do mar. Elas foram tolerantes a NaCl até concentrações de 60 g . L⁻¹, o que equivale a uma porcentagem de 6% (1,0 M) de sal. Contudo, esse estudo também demonstrou que com o aumento da salinidade do meio, essas linhagens tiveram aumento acentuado da inibição de seu crescimento. Esse fungo demonstrou tolerar um grande espectro de temperatura, desenvolvendo-se em ambientes com até 50° C. Segundo os autores, *P. sanguineus*, provavelmente, é capaz de crescer em troncos próximos à praia porque essa ilha tem chuvas frequentes, o que lavaria o substrato e diminuiria sua salinidade. Além disso, ele é euritérmico, o que explicaria sua adaptação a locais abertos e com alta exposição à luz solar.

André e outros (2010), utilizando glicerol bruto 0,2M, proveniente da produção de biodiesel, verificou que o fungo *Lentinula edodes* AMRL121 apresentava biomassa de 5,3 g . L⁻¹ com 504 horas de cultivo (21 dias), em fermentação líquida sob agitação de 60rpm, pH 4,0 e 25° C. Nessas mesmas condições, mas sem o acréscimo de glicerol, verificou-se uma

biomassa de $4,0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Esses dados mostram um estímulo na produção de biomassa de 132,5% em *L. edodes* AMLR121, contra o estímulo de 186,15% observado com *D. elegans* SXS323, em condições semelhantes, indicando uma maior capacidade de adaptação desse fungo a meio com alta concentração de glicerol.

Este trabalho permite observar que a salinidade é um fator de inibição à produção de lacase pelo basidiomiceto *D. elegans* SXS323, visto que detectou-se valores mais baixos de atividade em meio com 0,5M de NaCl, comparando-se com o controle. Ao contrário desse resultado, D'Souza e outros (2006) isolaram um basidiomiceto originário de uma região de mangue, na Índia. que teve seu pico na produção de lacase de quase $5000,0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ em 12 dias (288 horas), em meio contendo 2,5 % de sal marinho. Essa atividade enzimática foi maior do que a encontrada em meio sem sal (aproximadamente, $1,2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, com 144 horas). A atividade de MnP registrada foi de $2,29 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, em 192 horas. Porém, em meio contendo NaCl 0,5 M foi registrada a atividade de MnP de $1,67 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, com 96 horas de fermentação. Li e outros (2003) conseguiram determinar a atividade de MnP em meio com 0%, 3% e 5% de sal marinho, sendo o pico de atividade verificado em meio com 3% de sal marinho, com 10 dias de ensaio (240 horas). Eles também encontraram atividade de lacase, com pico de $0,9 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$, em 192 horas, no meio sem sal. Nesse estudo, a presença do sal também inibiu fortemente a atividade de lacase. Mas não é possível comparar com as atividades de MnP, pois as duas linhagens estudadas não tiveram atividade dessa enzima em níveis detectáveis.

Coelho e outros (2010) estudaram a capacidade do fungo da podridão branca *Ganoderma lucidum* em degradar os herbicidas diurom e bentazon, em meio líquido estacionário. Eles conseguiram detectar a atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase no fungo *Ganoderma lucidum*, porém não observaram a produção de lignina peroxidase. Na fermentação sem diurom, a atividade de lacase detectada no estudo supracitado foi de $20 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomassa seca. Porém, em meio com $80 \mu\text{M}$ de diurom ($18,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), houve um

aumento da atividade para $207 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomassa seca. Um estímulo mais discreto foi observado com MnP, ela foi menor que $0,5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ e subiu para $1,8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, para os meio sem e com $80 \mu\text{M}$ de diurom, respectivamente. Embora não se possa afirmar que *D. elegans* SXS23 realmente produza enzimas ligninolíticas nas condições estudadas neste trabalho, os dados numéricos sugerem que este basidiomiceto possa ter o mesmo comportamento enzimático apresentado por *G. lucidum*. Do mesmo modo, percebeu-se um indício de indução de lacase e MnP em meio com diurom, fato também observado em *G. lucidum*.

Em um estudo realizado por Bending e outros (2002), foi testada a influência da atividade de enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos na degradação dos herbicidas metalaxil, atrazina, diurom, iprodione, terbuthylazine e chlorpyrifos. A atividade de ligninase foi aferida através da capacidade desses basidiomicetos em degradar o corante Poly R-478. Todas as linhagens estudadas foram capazes de degradar tal corante, indicando a produção de ligninases. Contudo, não foi possível relacionar essa atividade enzimática com a capacidade degradativa dos herbicidas testados. Esse estudo mostrou que o fungo *Stereum hirsutum* teve uma baixa produção de ligninase, mas foi capaz de degradar 80,4% do herbicida diuron em 42 dias. Já o basidiomiceto *Auricularia auricola* teve alta atividade enzimática e baixa capacidade degradativa de diurom (10,7%) num período de 42 dias. Assim como esse estudo, os resultados aqui apresentados não mostram uma correlação entre atividade ligninolítica e degradação de diurom.

O presente trabalho não permitiu uma clara correlação entre a produção de ligninases e a degradação do herbicida diurom. Isso indica que outro sistema enzimático pode estar envolvido na degradação do herbicida, como a mono-oxigenase citocromo P450. Giacomazzi e Cochet (2004) relatam que observaram uma inibição na capacidade de uma linhagem da bactéria *Arthrobacter* em degradar diurom, quando submetido a metirapona, uma reconhecido inibidor de citocromo P450.

7 CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos nos experimentos, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- O comportamento dos basidiomicetos testados em meio líquido levemente agitado e com NaCl 0,5M foi variável, com linhagens fortemente inibidas, como *Datronia caperata* MCA5, *Gloeophyllum striatum* MCA2, *Gloeophyllum striatum* MCA7 e *Hexagonia hirta* MCA131 outras, como *Pycnoporus sanguineus* MCA16, *Polyporus tenuiculus* MCA9 e *Polyporus tenuiculus* MCA11, com nível intermediário de inibição e algumas linhagens tiveram seu crescimento estimulado no meio salino, que foi o caso das linhagens *Datronia stereoides* MCA167, *Dacryopinax elegans* SXS323 e *Polyporus sp.* MCA128.
- A salinidade afetou mais drasticamente as linhagens testadas em meio com NaCl 0,6M e 0,8M, observando-se um decréscimo da capacidade adaptativa dos fungos em meio com maior concentração salina.
- O fungo basidiomiceto *Dacryopinax elegans* SXS323 foi capaz de crescer em meio líquido contendo diurom como única fonte de carbono, indicando que esse microrganismo tem potencial para ser usado em biorremediação.
- *D. elegans* SXS323 também foi capaz de crescer em meio contendo cloreto de sódio em concentração de 0,5M e utilizar manitol a 0,5M ou glicerol a 0,5M como fontes de carbono.
- Apesar da degradação do diurom, não foi detectada, pela metodologia adotada, relação entre esse processo e a atividade de lacase secretada pelo

fungo. Os valores de lignina peroxidase também foram muito baixos e sem correlação com a degradação do herbicida.

- Os valores de atividade de manganês peroxidase, embora muito baixos, foram diferentes em função dos tratamentos e dentro de um mesmo tratamento, sendo os maiores valores detectados em meios com diuron, sugerindo indução pelo diuron.

8 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.

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

ANDRÉ, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops Products**, v. 31, p. 407-416, 2010.

ANKE, H. WEBER, R. W. S. White rots, chlorine and the environment – a tale of many twist. **Mycologist**, v. 20, p. 83-89, 2006.

BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 26, p. 78-87, 1994.

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.

BLANCHETTE, R.A. Degradation of lignocellulose complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 999-1010, 1995.

BOIS, G.; PICHE, Y.; PUNG, M. Y. P.; KHASA, D. P. Mycorrhizal inoculum potentials of pure reclamation materials and revegetated tailing sands from the Canadian oil sand industry. **Mycorrhiza**, v. 15, p. 149-158, 2005.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v. 255, p. 445-450, 1988.

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.

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.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**, Ed. Elsevier Academic Press , ed.2, 588 f., 2002

CASTILLO, G.; DEMOULIN, V. NaCl and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. **Mycology Research**, v. 101, p. 341-344, 1997.

CHEN, D. M.; ELLUL, S.; HERDMAN, K.; CARNEY, J. W.G.. Influence of salinity on biomass production by australian *Pisolithus* spp. isolates, **Mycorrhiza**, v. 11, p. 231-236, 2001.

CHEN, D. M.; KHALILI, K.; CAIRNEY, J. W. G. Influence of water stress on biomass production by isolates of an ericoid mycorrhizal endophyte of *Wollisia pungens* and *Epacris microphylla* (Ericaceae). **Mycorrhiza**, v. 13, p. 173-176, 2003.

COELHO, J. S.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Effect of the herbicides bentazon and diuron on the production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 156-161, 2010.

CONESSA, A.; PUNT, P. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 143-158, 2002.

DRITSA, V.; RIGAS, F.; NATSIS, K.; MARCHANT, R. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1741-1747, 2007.

D' SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMAR, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 504-511, 2006.

DUCROS, V.; BRZOZOWSKI, A.M.; WILSON, K.S.; OSTERGAARD, P.; SCHNEIDER, P.; SVENDSON, A.; DAVIES, G.J. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. *Acta Crystallography, Section D* v. 57, p. 333-336, 2001.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

EICHLEVORÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. **Dyes and Pigments**, v. 75, p. 38-44, 2007.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 37-42, 2009.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSUKLAURI, N.; KHARDZIANI, T.; METREVELI, E. Physiological regulation of Basidiomycetes ligninolytic enzymes production. **Journal of Biotechnology**, v. 136S, p. S290, 2008.

EMPADINHAS, N.; COSTA, M. S. To be or not to be a compatible solute: Biodiversity of mannosylglycerat and glucosylglycerate. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, p. 159-168, 2008.

ESPOSITO, E.; PAULILLO, S. M.; MANFIO, G. P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomicetes. **Chemosphere**, v. 37, p. 541-548, 1998.

FAISON, B. D.; KIRK, T. K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 299-304, 1985.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELISB, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573-580, 2009.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environment impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v. 1021-1032, 2004.

GLENN, J.K., AKILESWAREAN, L., GOLD, M.H. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.251, p.688-696, 1986.

GRANT, W. D. Life at low activity. **Philosophical Transactions of Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, p. 1249-1267, 2004.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidase in baiological lignolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 349-355, 2008.

HAYNES, D.; RALPH, P.; PRANGES, J.; DENNISON, B. The impact of herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. **Marine Pollution Buletin**, v. 41, p. 288-293, 2000.

HENN, C. Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom - Produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos, 136 p., 2009. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

HIBBETT, D. S., *et al.* A hagher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 80, p. 204-213, 2004.

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

KARAM, J.; NICELL, J. A. Potential application of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.

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

KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KOKOL, V.; DOLISKA, A.; EICHNLEROVÁ, I.; BALDRIAN, P.; NERUD, F. Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinosum* and by purified laccase and Mn-peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1673-1677, 2007.

LEITÃO, A. L.; DUARTE, M. P.; SANTOS OLIVEIRA, J. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicilium chrysogenum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 220-225, 2007.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; *et al.* Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175-185, 1999.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi III: biobleaching of unbleached kraft pulp by hypersaline-tolerant manganese peroxidase from a marine white rot isolate, *Phlebia* sp. MG-60. **Journal of Wood Science**, v. 49, p. 42-46, 2003a.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi IV: effects of Mn^{2+} and NH_4^+ on manganese peroxidase production and Poly R-478 decolorization by the marine isolate *Phlebia* sp. MG-60 under saline conditions. **Journal of Wood Science**, v. 49, p. 355-360, 2003b.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi I: screening of lignin-degrading fungi in hypersaline conditions. **Journal of Wood Science**, v. 48, p. 147-152, 2002.

LUI, J. Phenylurea herbicides. In: KRIEGER, R. **Hayes' Handbook of Pesticides Toxicology**, Ed. Elsevier Academic Press, ed.3, 2010

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MATSUDA, Y.; SUGIYAMA, F.; NAKANISHI, K.; ITO, S. Effects of sodium chloride on growth of ectomycorrhizal fungal isolates in culture. **Mycoscience**, v.47, p. 212-217, 2006.

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

MIYAZAKI, Y.; HIRAIDE, M.; SHIBUYA, H. Molecular cloning of functional genes for high growth-temperature and salt tolerance of the basidiomycete *Formitopsis pinicola* isolated in a mangrove forest in Micronesia. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 273-278, 2007.

MONARD, C.; MARTIN-LAURENT, F.; VECCHIATO, C.;FRANCEZ, A. J.; VANDERKOOORNHUYSE, P.; BINET, F. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2253-2259, 2008.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**, 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996.

MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**, 110 p., 2006. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.

MUÑOZ, G. M. D. **Fungal diversity present at a hypersaline environment in Cabo Rojo, Puerto Rico, determined by characterization of isolates and analysis of environmental rRNA genes clones libraries**.126p. 2006. Dissertação de mestrado, Universidade de Puerto Rico.

NAGARATHNAMMA, R.; BAJPAI, P.; BAJPAI, P. K. Studies on decolourization, degradation na detoxification of chlorinated lignin compounds in Kraft bleaching effluents by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 939-948, 1999.

OKEKE, B. C.; PATERSON, A.; SMITN, J. E.; WATSON-CRAIK, I. A. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solids substrate cultures of *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 563-569, 1997.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTDT, G.;HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols ba redox shyttle-mediated enzymatic. **The plant cell**, v. 14, p. 1953-1962, 2002

OREN, A. Bioenergetic aspect of halophilism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 334-348, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7. ed. Rio de Janeiro: Ed. Gauanabara Koogan, 2007.

RIGAS, F.; DRITSA, V. Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 120-124, 2006.

RODRÍGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 411-422, 1988.

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

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidase and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2563-2605, 1996.

STEFFEN, K. T.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA, A. Purification and characterization of manganese peroxidase from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 550-555, 2002.

TIEN, M., KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K.; Kellogg, S. T. **Methods in Enzymology**, v. 161, part B, p. 238-249, 1988.

TOMAZ, R. M. A. G. **Avaliação de fungos com potencial de degradação de diuron e pyrithiobac-sodium**, 116 p., 2003. Dissertação de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

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

TRESNER, H. D.; HAYES, J. A. Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi, **Applied Microbiology**, v. 22, p. 210-213, 1971

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169-183, 2000.

ZOUARI-MECHICHI, H.; MECHICHI, T.; DHOUIB, A; SAYADI, S.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Laccase purification and characterization from *Trametes troglitii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 141-148, 2006.

APÊNDICE

Cromatogramas das condições de degradação do herbicida diurom testadas

Amostras de 240 horas e padrões para construção da curva de calibração

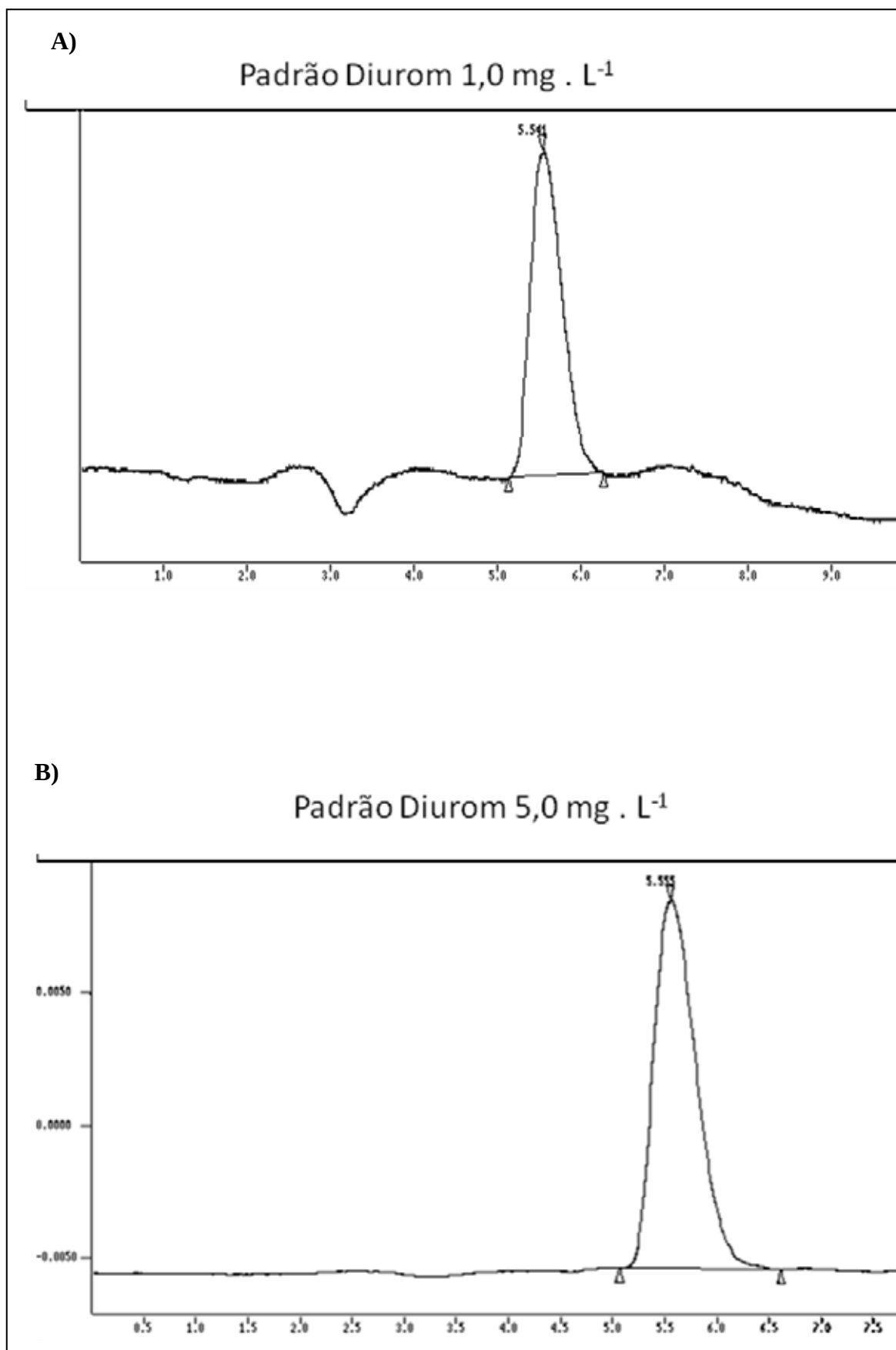
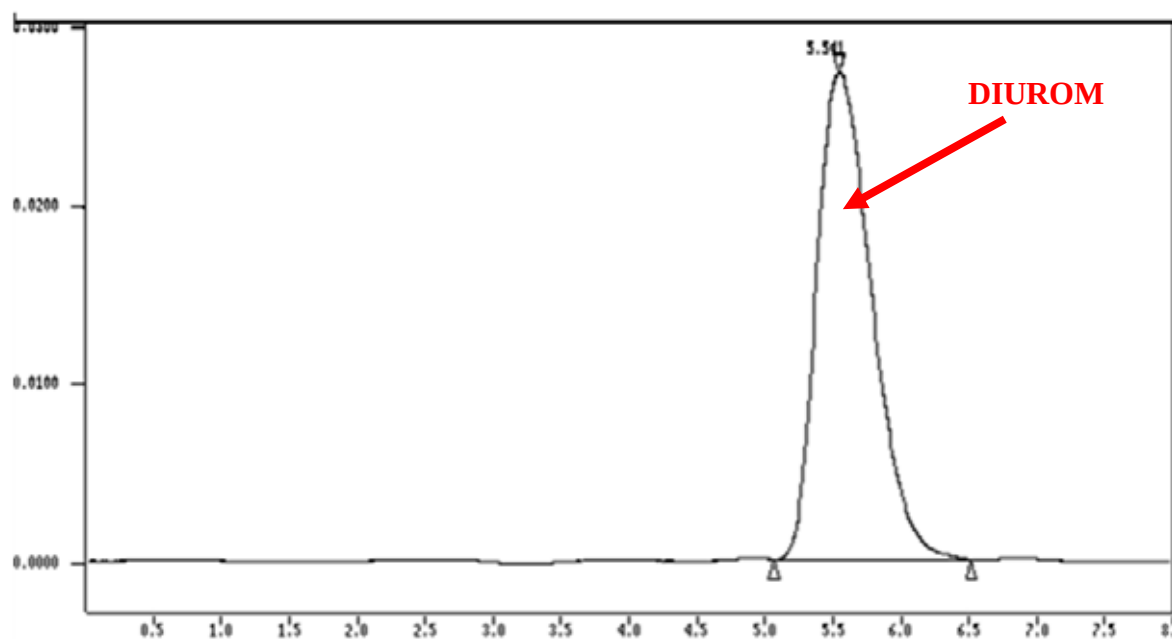


Figura 34 – Cromatogramas dos padrões de diurom, nas concentrações de 1,0 mg . L⁻¹(A) e 5,0 mg . L⁻¹(B), analisadas em HPLC. Detector a 240 nm

A)

Padrão Diurom 10,0 mg . L⁻¹

B)

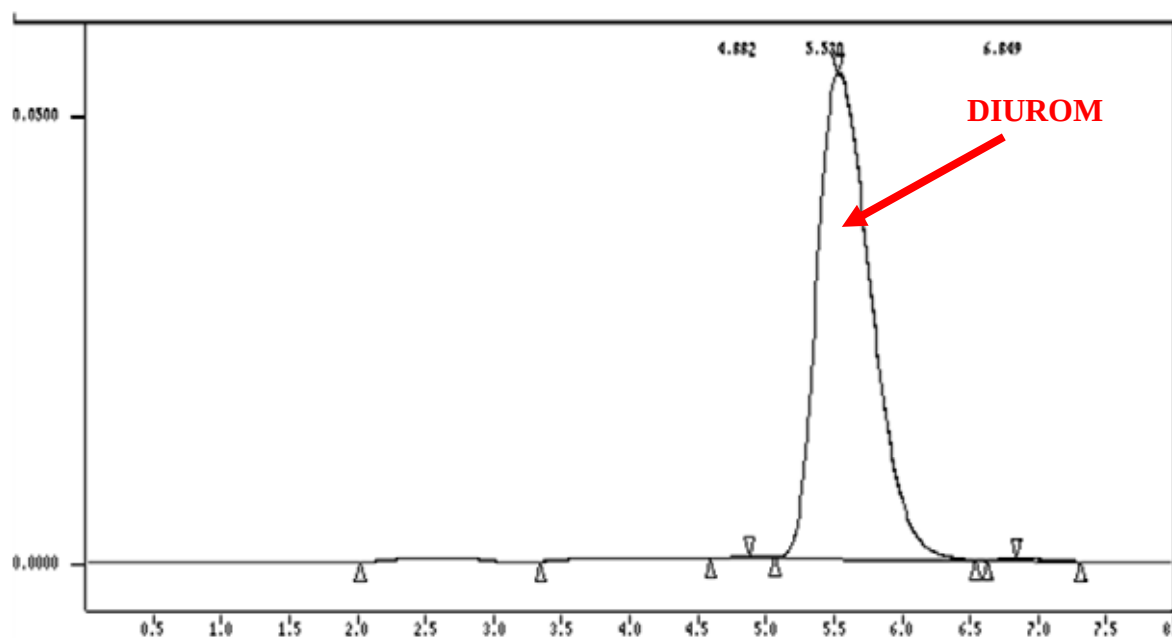
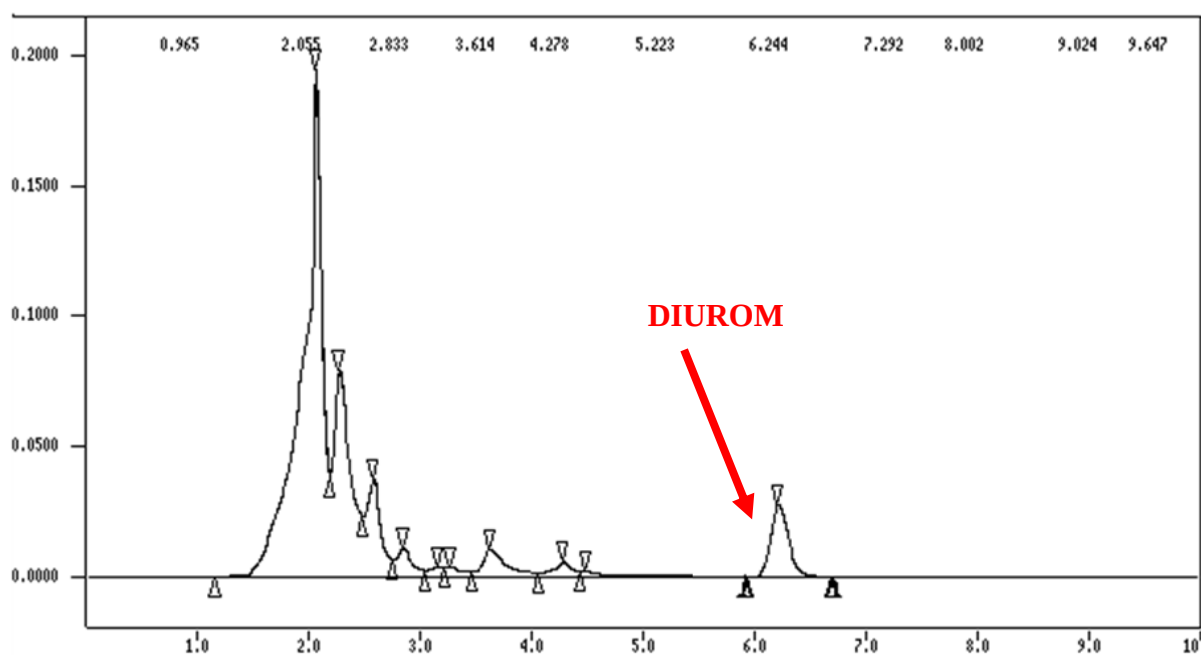
Padrão Diurom 20,0 mg . L⁻¹

Figura 35 – Cromatogramas dos padrões de diurom, nas concentrações de 10,0 mg . L⁻¹(A) e 20,0 mg . L⁻¹(B), analisadas em HPLC. Detector a 240 nm

Diurum 10mg/ L (não inoculado) – 240 horas



Diurum 10mg/ L (inoculado) – 240 horas

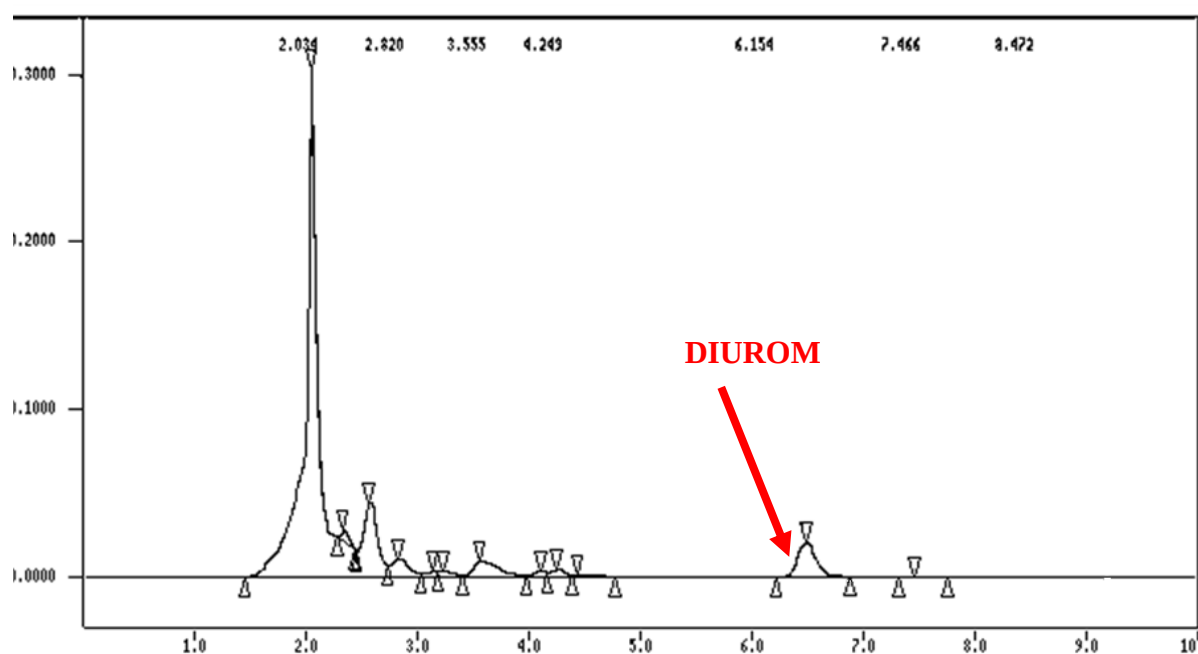


Figura 36 – Cromatogramas do meio adicionado diurum 10,0 mg . L⁻¹, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

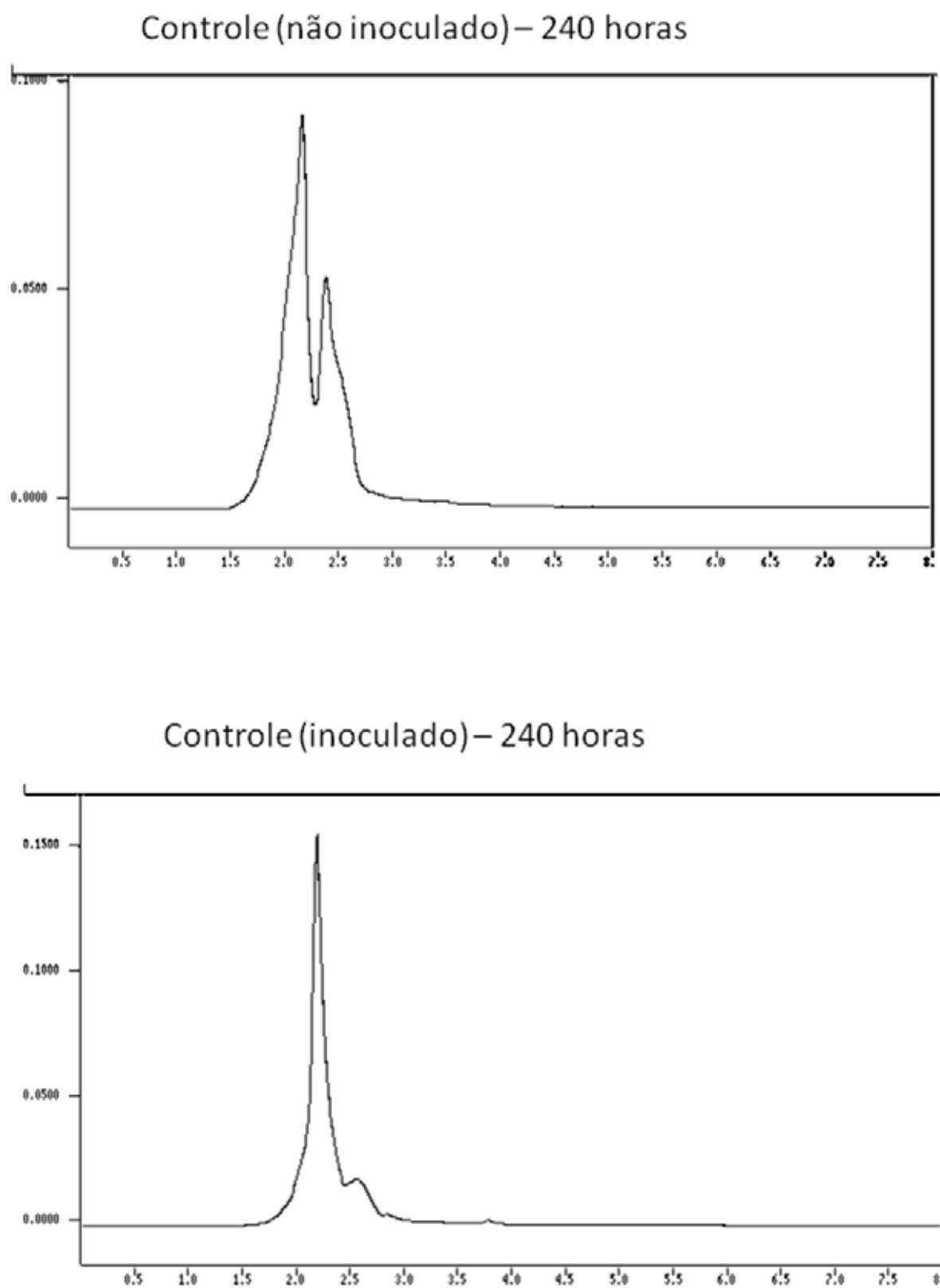
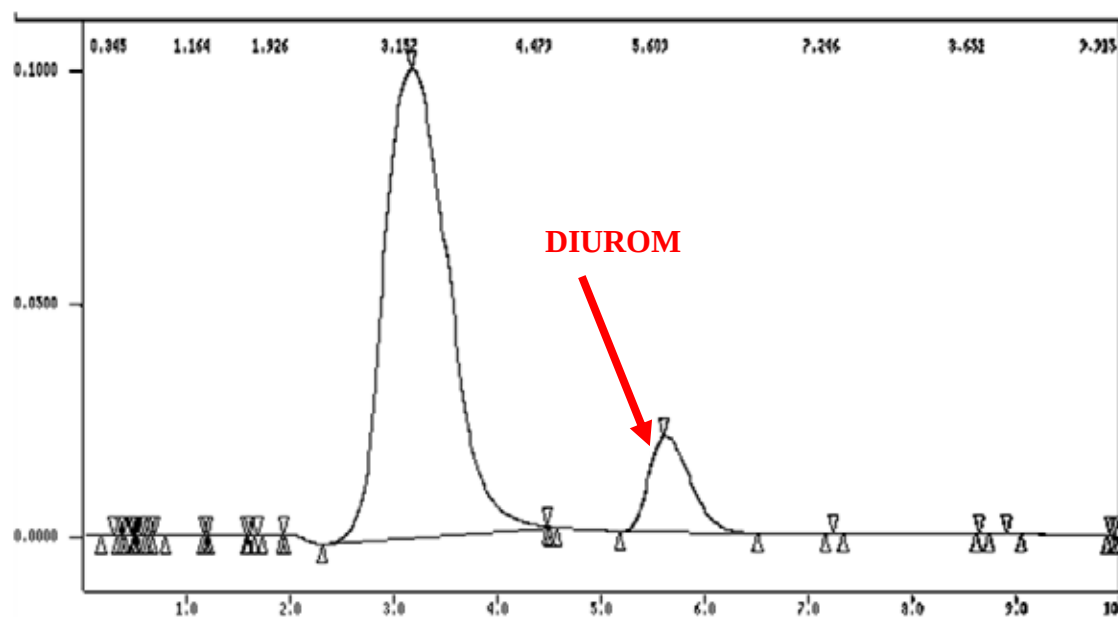


Figura 37 – Cromatogramas do meio sem adição de diurom, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

Cloreto de sódio 0,5M + diurom 10,0 mg/L (não inoculado) – 240horas



Cloreto de sódio 0,5M + diurom 10,0 mg/L (inoculado) – 240horas

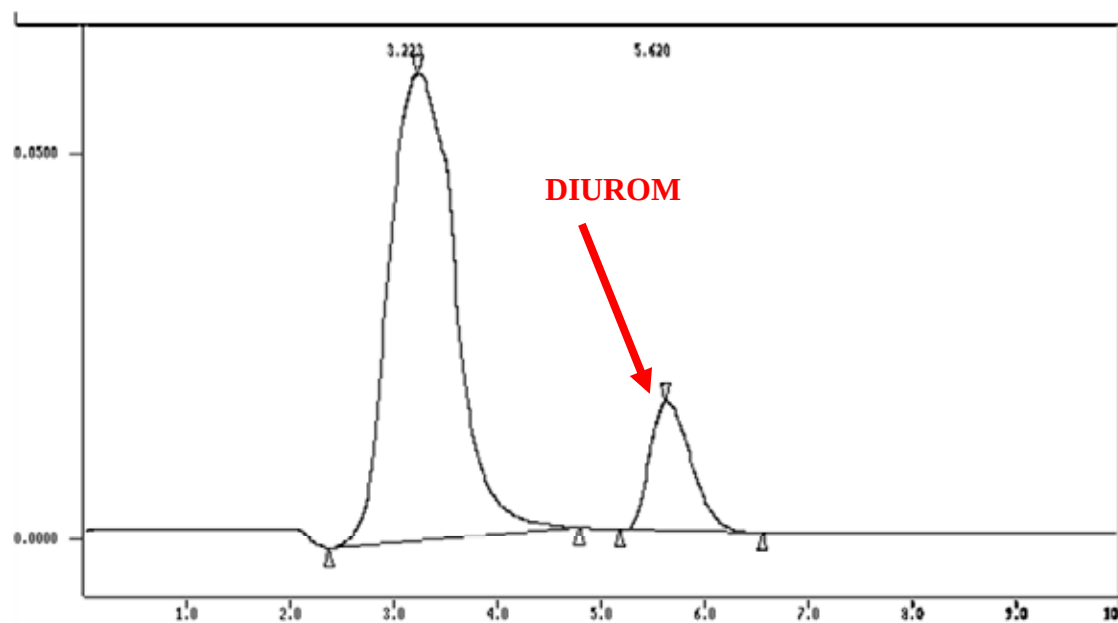
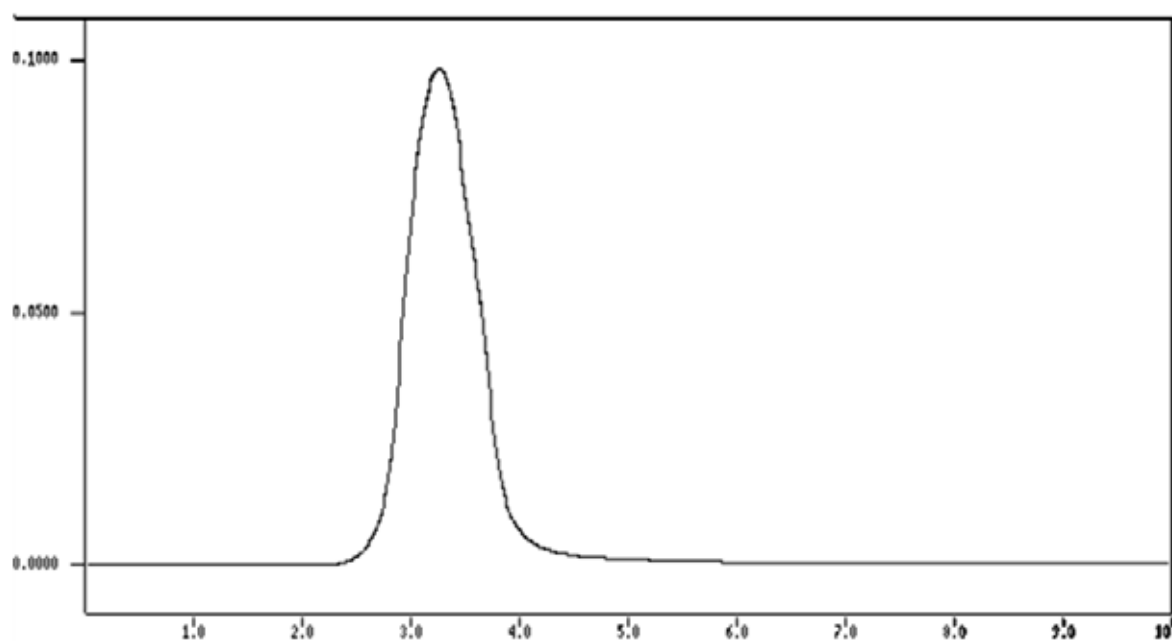


Figura 38 – Cromatogramas do meio com adição de cloreto de sódio 0,5M e diurom 10,0 mg . L⁻¹, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

Cloreto de Sódio 0,5M (não inoculado) – 240 horas



Cloreto de Sódio 0,5M (inoculado) – 240 horas

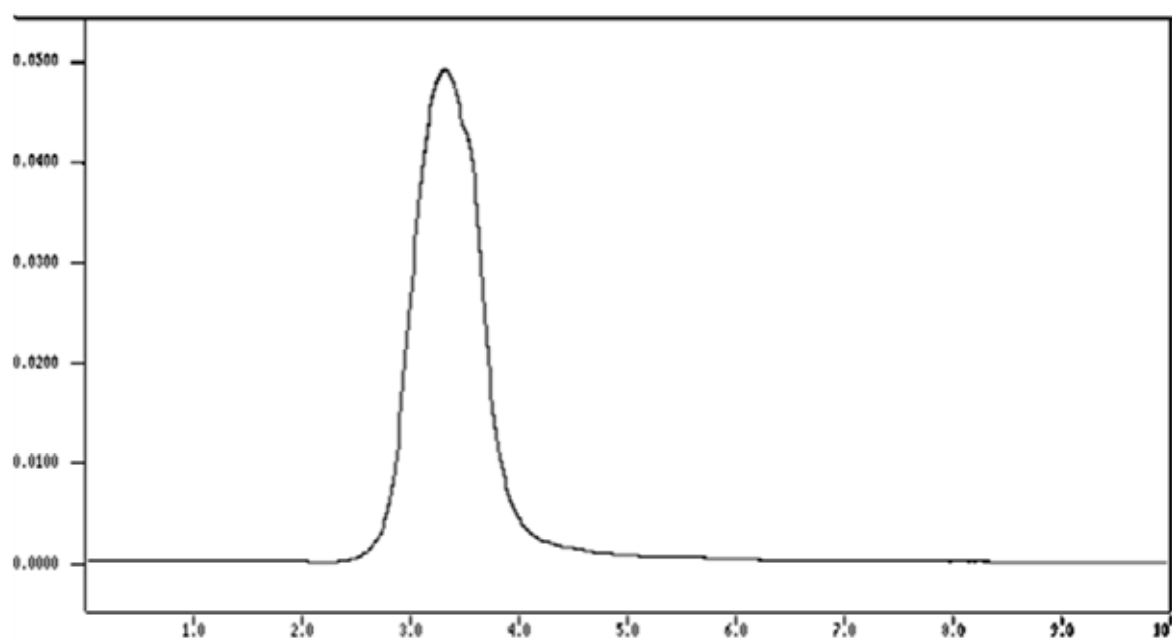


Figura 39 – Cromatogramas do meio com adição de cloreto de sódio 0,5M, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

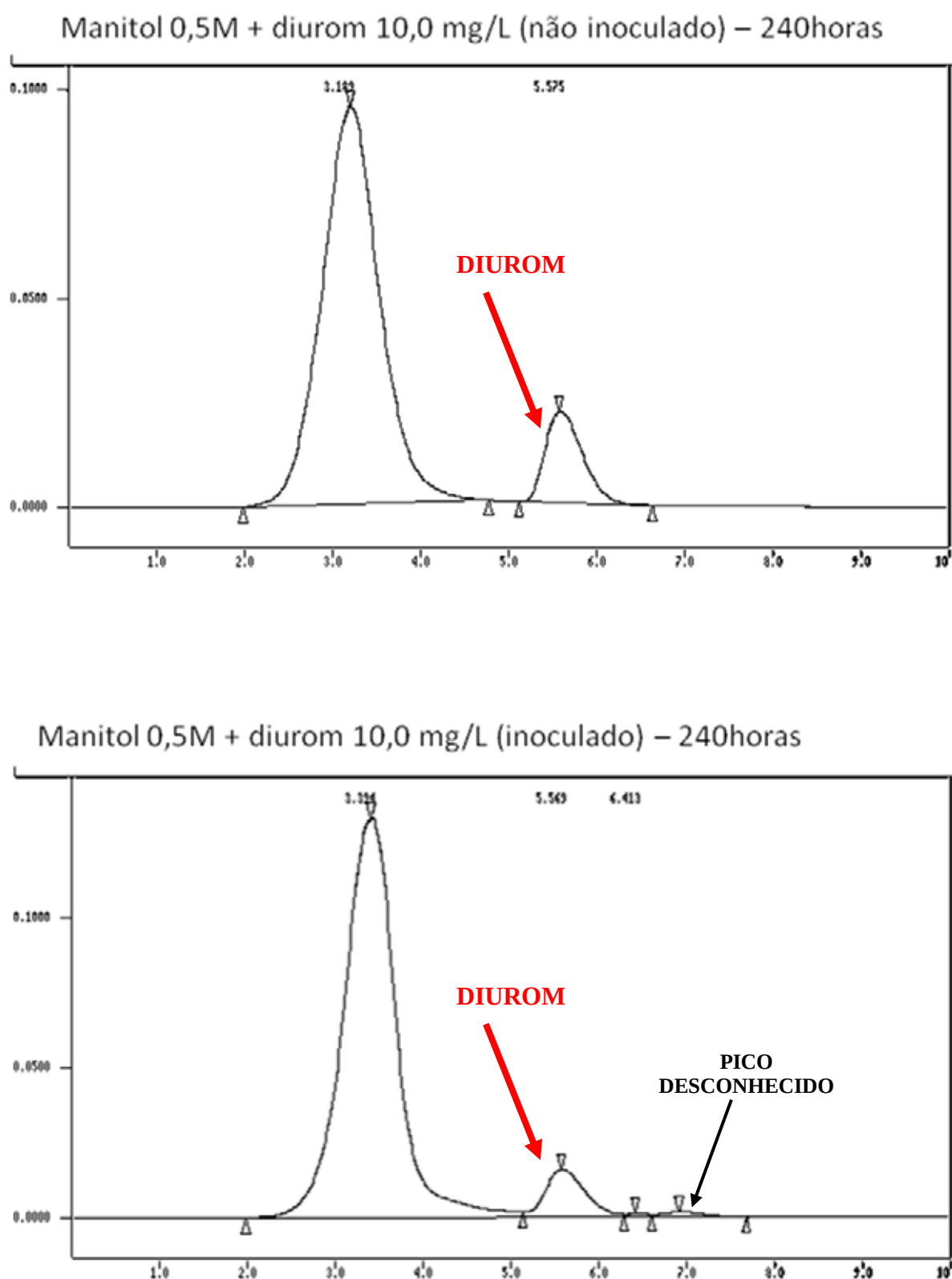


Figura 40 – Cromatogramas do meio com adição de manitol 0,5M e diurom 10,0 mg . L⁻¹, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

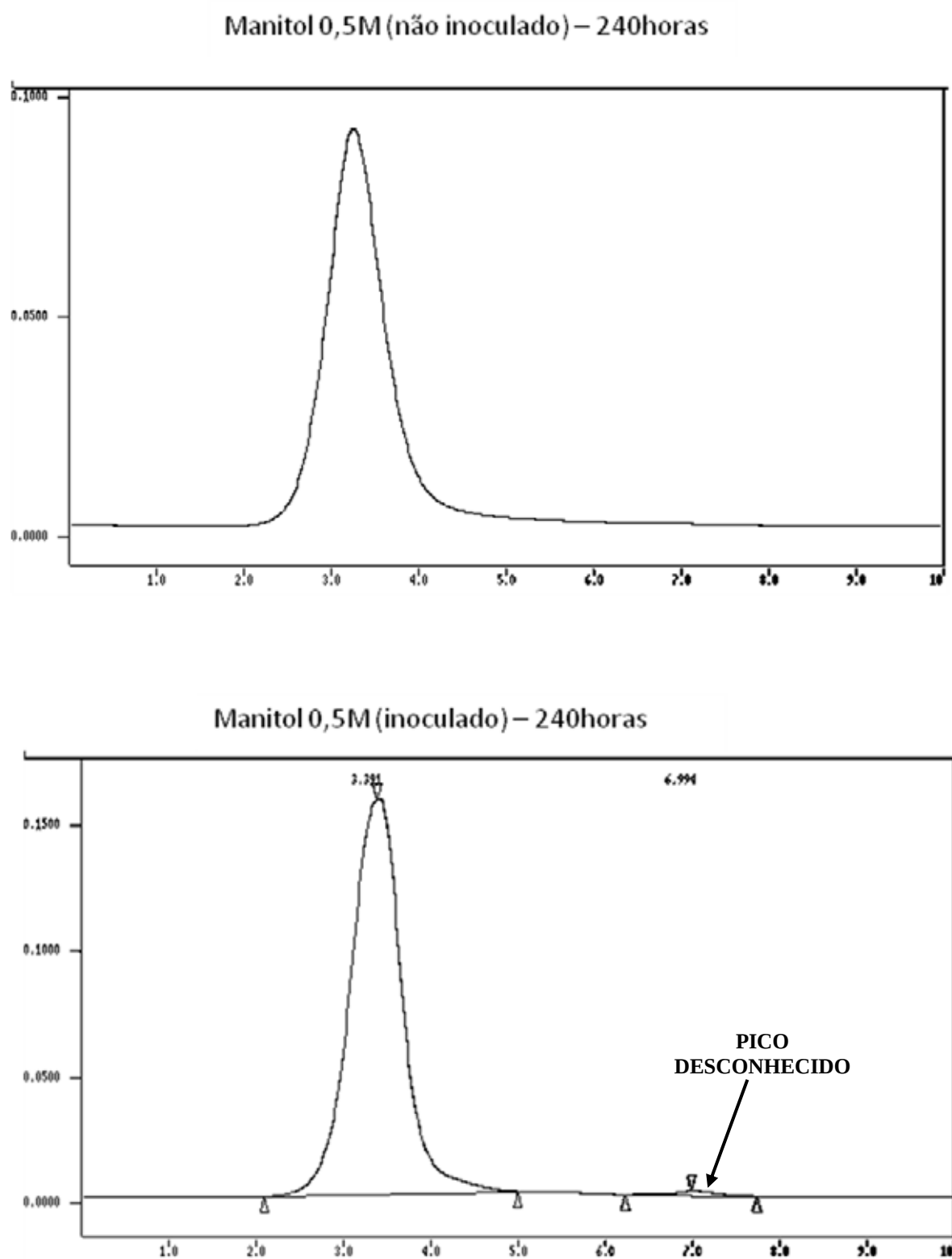


Figura 41 – Cromatogramas do meio com adição de manitol 0,5M, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

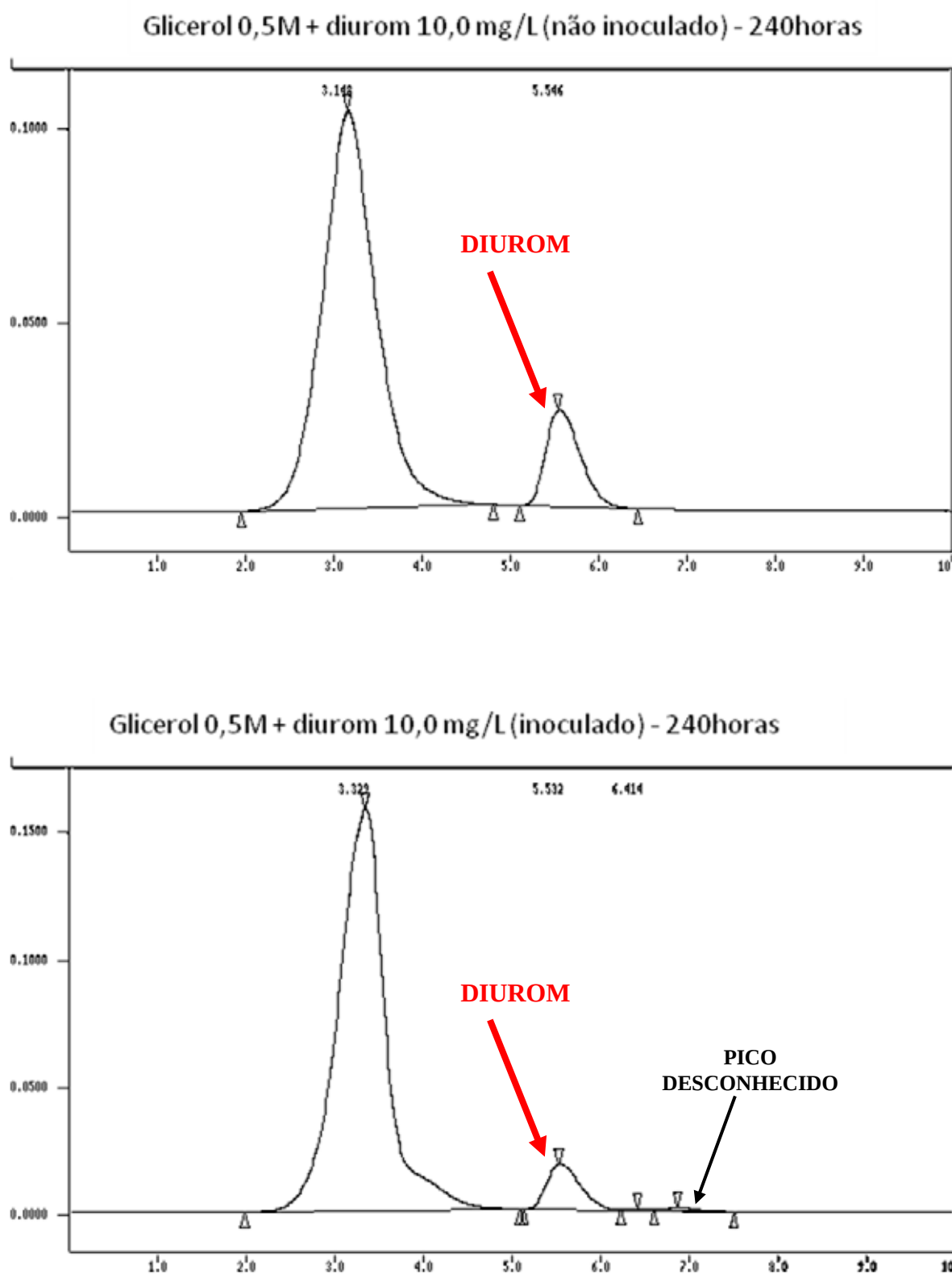


Figura 42 – Cromatogramas do meio com adição de glicerol 0,5M e diurom 10,0 mg . L⁻¹, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm

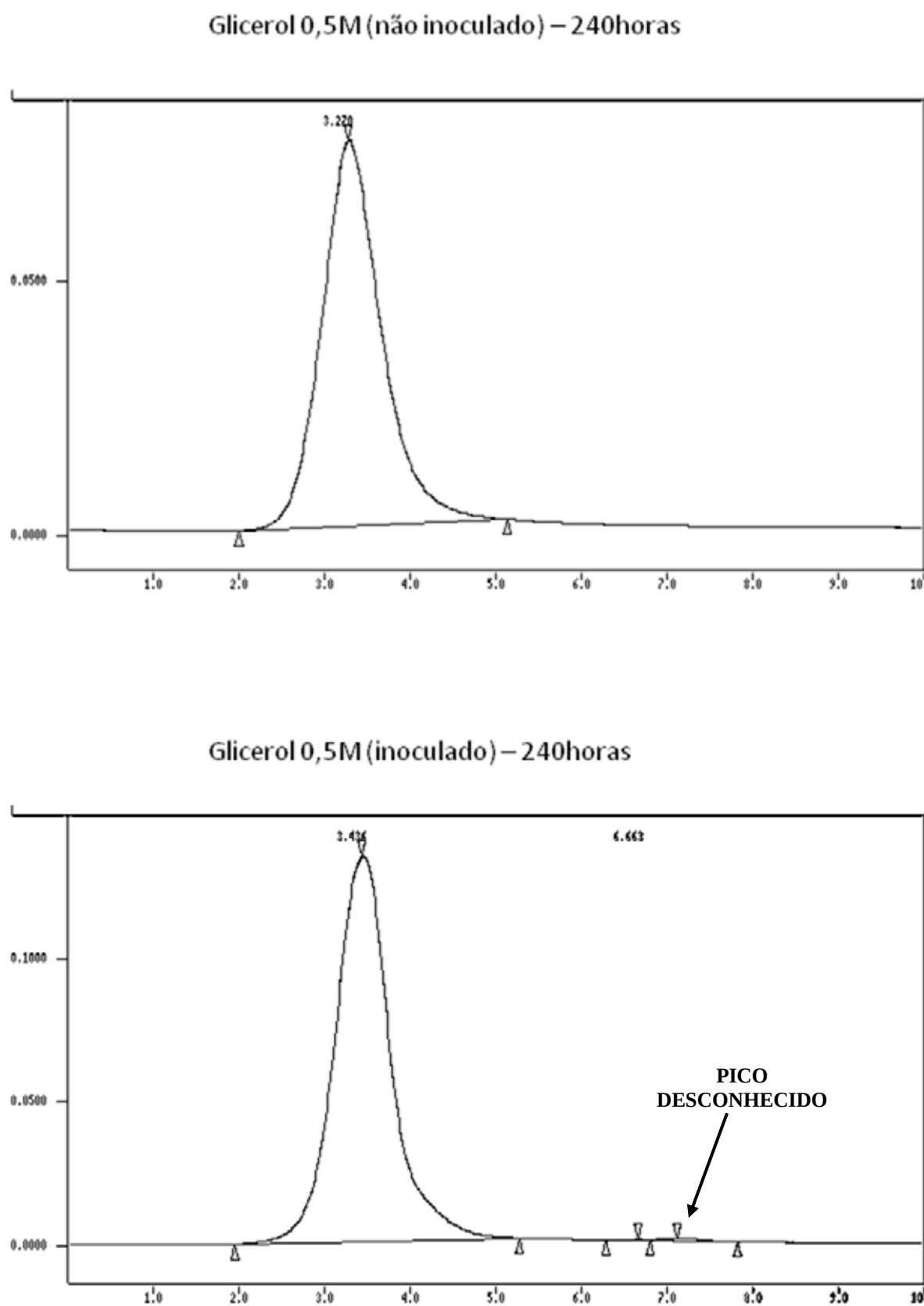


Figura 43 – Cromatogramas do meio com glicerol 0,5M, com 240 horas de fermentação. **A)** Meio não inoculado. **B)** Meio inoculado. Detector a 240 nm