



# Mini-curso: Utilização de basidiomicetos na degradação de compostos recalcitrantes

## **Ministrantes:**

Caroline Aparecida Vaz de Araújo  
Jaqueline da Silva Coelho-Moreira  
Rafael Castoldi  
Thatiane Rodrigues Mota

**Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos**  
**Responsável:** Dra Rosane Marina Peralta

## **Introdução**

As moléculas orgânicas de difícil degradação, denominadas “recalcitrantes”, podem ser de origem natural, sintetizadas pelo metabolismo dos organismos, ou sintética, produzidas por indústrias e estranhas ao ambiente e, por esta razão, são denominadas “xenobióticas” (do grego *xenos* = estrangeiro). Desde o início do século XX, moléculas xenobióticas vêm sendo lançadas no ambiente e compreendem vários tipos de compostos oriundos principalmente de atividades industriais e da agricultura, como por exemplo, agrotóxicos, corantes, fármacos, polímeros e plásticos. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação representam potenciais ameaças aos organismos vivos, podendo provocar desde sérias intoxicações até efeitos mutagênicos em diversos organismos da comunidade biológica afetando a estrutura e funcionamento do ecossistema, além da saúde humana. Por estas razões, há um crescente interesse em desenvolverem novas tecnologias para descontaminar ambientes poluídos por xenobióticos.

Este mini-curso irá abordar os processos biológicos de descontaminação ambiental baseados na utilização de fungos filamentosos, uma tecnologia conhecida como biorremediação.

Visto que, as atividades industriais e a agricultura são as principais fontes poluidoras do ambiente e que as classes de moléculas xenobióticas são inúmeras, o nosso mini-curso tem como foco duas classes de compostos amplamente utilizados nestas atividades, os corantes e os agrotóxicos da classe dos herbicidas.

## **Corantes**

Os corantes sintéticos são muito utilizados em diversos tipos de indústrias, como a têxtil, farmacêutica, alimentícia, cosméticos, papel, entre outras.

Aproximadamente 10.000 tipos de corantes e pigmentos são utilizados nas indústrias e mais de  $7 \times 10^5$  toneladas de corantes sintéticos são produzidos anualmente no mundo. Em 1996 a produção mundial de corantes foi de  $8 \times 10^5$  toneladas (Heinfling et al., 1998).

A principal característica dos efluentes gerados nas indústrias têxteis é presença de uma água residual contendo elevada carga orgânica, cor acentuada e compostos tóxicos (figura 1), ao homem e ao meio ambiente (Paschoal e Tremiliosi-Filho, 2005).

De acordo com a estrutura dos corantes e o seu potencial tóxico, genotóxico e mutagênico, a maioria deles representam um perigo para todas as formas de vidas, podendo afetar vários órgãos e sistemas dos animais, causar reações alérgicas, dermatoses, além de propriedades carcinogênicas e mutagênicas que são atribuídas principalmente aos corantes com ligações azo ou nitro-amino, os quais podem causar tumores de fígado e bexiga de animais em experimentos.



Figura. 1: Empresa têxtil despejando efluente no ribeirão Jacaré em área rural de Itatiba-SP (2007). Foto Gustavo Franco

## Herbicidas

Desde 2008, o Brasil ocupa o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. O consumo destes compostos vem crescendo a cada ano; em 2011 houve um crescimento de 10% em relação ao ano anterior. As vendas foram impulsionadas principalmente pelas culturas de soja, cana, milho, algodão, café e pastagem (Sindag, 2012).

Atualmente, os agrotóxicos da classe dos herbicidas estão entre os mais utilizados, juntamente com os inseticidas e fungicidas (figura 2).

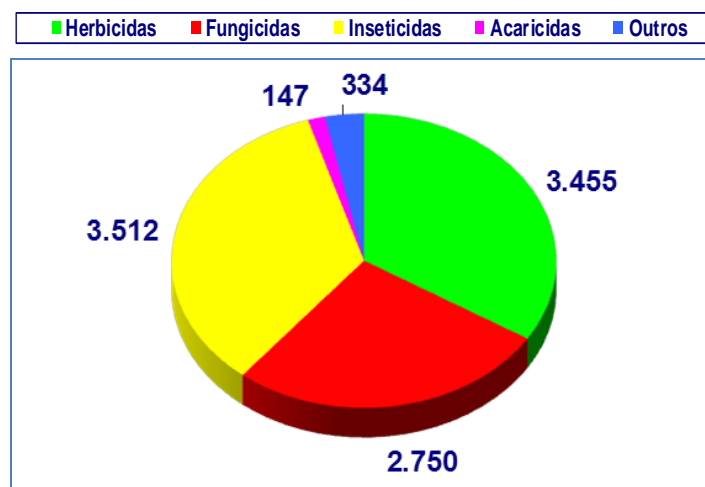


Figura 2. Estimativa do mercado de agrotóxicos acumulado em 2011 (Milhões R\$).  
Fonte: Sindag, 2012.

## **Descontaminação do ambiente**

Apesar da grande diversidade de substâncias químicas lançadas no ambiente, existe uma atenuação natural da poluição em locais contaminados. Na verdade, vários processos químicos, físicos e biológicos podem ocorrer para evitar o acúmulo de poluentes no ambiente. Estes processos incluem a volatilização, oxidação abiótica, hidrólise e biodegradação por microrganismos nativos (Gianfreda & Rao, 2004). No entanto, dependendo da estrutura química da molécula, do modo e quantidade correta de aplicação e das características gerais do ambiente, ocorre o acúmulo a índices considerados tóxicos (Chowdhury et al. 2008).

Compostos químicos poluentes podem ser eliminados do ambiente por incineração, lavagem dos solos e outras técnicas convencionais. Contudo, estes métodos apresentam altos custos e impactos negativos sobre o ambiente. A biorremediação mostra-se como uma alternativa competitiva, pois, o uso de sistemas biológicos pode apresentar baixo custo e mínimo impacto ambiental em relação aos processos convencionais.

## **Biodegradação e Biossorção**

A biorremediação é uma tecnologia alternativa de tratamento de locais contaminados com xenobióticos e baseia-se no uso de sistemas biológicos, como bactérias, fungos e enzimas, na degradação de poluentes ambientais. Por ser uma forma natural de degradação de compostos químicos, promove um tratamento adequado, sendo de baixo custo e de mínimo impacto ambiental em relação às técnicas convencionais de remediação.

Os corantes e herbicidas, de uma forma geral, apresentam uma estrutura complexa, quimicamente e fotoliticamente estável e resistente aos processos de degradação naturais. No caso dos corantes, mesmo em baixas concentrações, os efluentes gerados apresentam altas quantidades de compostos orgânicos e coloração intensa na água.

O ideal é que os produtos da biodegradação tenha estrutura menos recalcitrantes em relação à molécula original ou na mineralização (conversão total dos compostos orgânicos) do xenobiótico, produzindo compostos químicos simples como:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-2}$  (Gaylarde et al., 2005).

Nas últimas décadas, a possibilidade de utilizar fungos basidiomicetos em estratégias de biorremediação tem obtido êxito nas pesquisas devido à habilidade destes fungos de degradar uma grande variedade de poluentes ambientais altamente persistentes por meios inespecíficos. Dentre os basidiomicetos mais utilizados estão os que causam a podridão branca da madeira.

Como um dos processos de biorremediação, a biossorção desempenha uma significativa função na remoção de xenobióticos de águas contaminadas. A biossorção é um processo físico-químico que envolve a adsorção de um composto químico na superfície celular de um material biológico que pode estar vivo ou morto (fungos, bactérias e algas). Os principais atrativos da biossorção

são a alta seletividade e eficiência, baixo custo e bom desempenho de remoção (Aksu, 2005). Outro processo comumente utilizado é a bioacumulação, baseado na incorporação do composto dentro da célula viva.

### **Biorremediação por fungos da podridão branca da madeira (White rot fungi)**

Os fungos são importantes componentes da microbiota e apresentam atividade degradativa de amplo espectro, podendo secretar grande diversidade de enzimas extracelulares, o que os torna capazes de metabolizar os mais diversos tipos de moléculas, incluindo compostos xenobióticos. Em seu ambiente natural, os fungos degradam polímeros contidos na madeira como a celulose, hemicelulose e lignina, a partir dos quais obtém energia para seu crescimento e reprodução. Os fungos da podridão branca (figura 3) são os únicos microrganismos capazes de degradar todos os polímeros da madeira, incluindo a lignina.



Figura 3: *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel (Foto: A. M. Gugliotta).

Fonte: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br>

A lignina é um polímero aromático e heterogêneo que fornece resistência ao tecido vegetal (figura 4). Sua complexa e irregular estrutura química faz da lignina muito resistente ao ataque de enzimas, sendo impossível sua absorção e degradação por mecanismos intracelulares. Por isso, os fungos da podridão branca da madeira desenvolveram mecanismos muito inespecíficos, baseados em enzimas extracelulares, para a degradação da lignina.

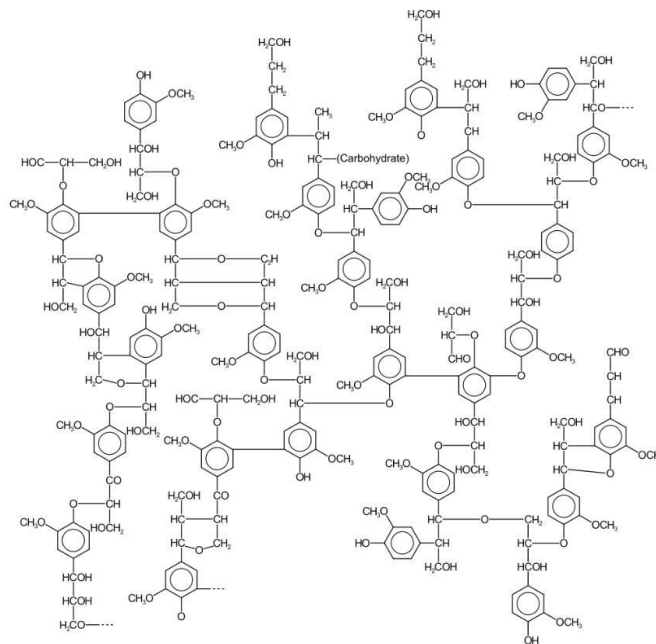


Figura. 4: Estrutura química da lignina

Foi com o entendimento do sistema enzimático de degradação da lignina por fungos da podridão branca que se propôs que os mesmos poderiam ser utilizados na degradação de poluentes ambientais. Esta capacidade deve-se à semelhança entre as estruturas da lignina e alguns compostos orgânicos sintéticos (Figura 5).

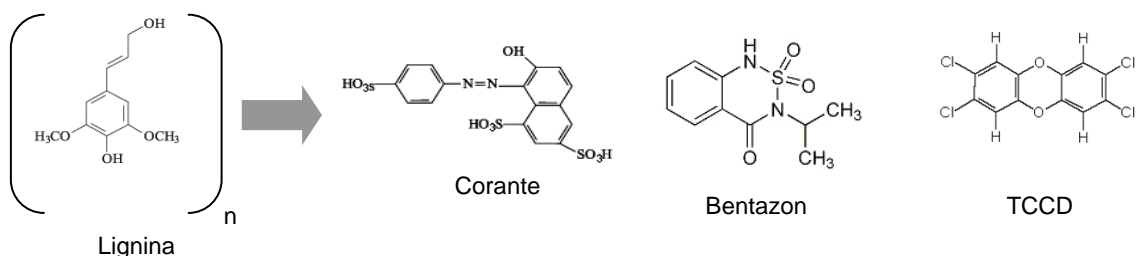


Figura 5: Comparação entre a estrutura química da lignina e de alguns compostos xenobióticos.

As enzimas microbianas mais importantes nos processos de biorremediação são a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). A natureza inespecífica do processo de degradação permite que essas enzimas sejam utilizadas na degradação ou mineralização de compostos com alta persistência.

Entre os fungos filamentosos, *Phanerochaete chrysosporium* tornou-se um sistema modelo para o estudo da degradação de xenobióticos sendo conhecida sua capacidade de degradar muitas classes de compostos, inclusive pesticidas, tais como bentazon, diuron, isoproturon e isoxaflutol (Castillo et al. 2000, Castillo et al. 2001, Fratila-apachitei et al. 1999, Mougin et al. 2000). O sucesso desta espécie de basidiomiceto tem estimulado estudos sobre outros fungos ligninolíticos com potencial para a biorremediação. É o caso de *Pleurotus pulmonarius*, *Coriolus versicolor* e *Tremetes versicolor* (Masaphy et al. 1996,

Hiratsuka et al. 2001, Uhnáková et al. 2009). Grande parte dos estudos aponta as enzimas ligninolíticas extracelulares como principais responsáveis pelos processos degradativos de moléculas poluentes.

### **Isolamento de microrganismos a partir do solo**

O isolamento de microrganismos permite o estudo detalhado de suas vias metabólicas, enzimas e produtos intermediários. E o isolamento permite detectar que tipo de degradação está ocorrendo no ambiente (catabólica ou cometabólica) (Melo e Azevedo, 1997).

Na mineralização, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e este diminui de concentração. Neste caso, as moléculas são quebradas em moléculas inorgânicas, tais como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  e  $\text{HCl}$ . Sendo este, portanto, o único meio de se eliminar totalmente o composto xenobiótico do ambiente.

No caso do cometabolismo, não há dispêndio de energia. Neste caso, o crescimento microbiano requer a presença de um substrato secundário como fonte de carbono e energia, podendo transformar a molécula sem retirar dela a energia para o seu desenvolvimento.

As populações degradadoras de pesticidas representam uma pequena fração da parcela total de microrganismos. Eles podem ser isolados de solos, águas, sedimentos e áreas contaminadas com pesticidas, ou ainda, pode-se recorrer à áreas agrícolas com histórico de aplicação de pesticidas.

Um caminho mais rápido e direto é realizar o isolamento seletivo de um determinado grupo de microrganismos previamente testados como eficientes agentes degradadores.

A comunidade microbiana, o número e o tipo de microrganismos encontrados são definidos pelas particularidades do reservatório do qual foram isolados, o solo. As influências mais comuns à atividade microbiana são: a localização geográfica, a temperatura, umidade, pH e aeração do solo, logo, também afetam diretamente na degradação de pesticidas no solo.

A procura de microrganismos degradadores de xenobióticos pode estar direcionada às áreas de aplicabilidade de pesticidas e o insucesso deste isolamento pode estar relacionado à recalcitrância da molécula em estudo, dificultando a sua degradação.

Quando o objetivo da coleta é somente o isolamento de microrganismos úteis com potencial de degradação, geralmente, procede-se a coleta diretamente da área de estudo, coletando-se pequenas sub-amostras e homogeneizando-as, para posterior análise. Deve-se observar também no ato da coleta informações adicionais do local, tais como: o tipo e o horizonte do solo para referências futuras.

Do mesmo modo, o transporte e o armazenamento do material devem ser feitos com cuidado para que a população microbiana não se altere. O ideal seria que as condições da amostra fossem mantidas em laboratório nas mesmas do ambiente, mas como isso é improvável, recomenda-se proceder ao isolamento imediatamente após a coleta ou poucos dias após, sendo que o ideal é que as análises sejam feitas em até 6 horas após a coleta.

Recomenda-se coletar as amostras nos cinco primeiros centímetros do solo, pois é nessa profundidade que a maioria dos microorganismos habita. Se na área amostrada não se encontrar um grande número de microorganismos, pode-se recorrer ao isolamento a partir de solo rizosférico ou raízes.

Técnicas de enriquecimento do solo e suplementação do meio de cultura com o pesticida em estudo tem a vantagem de estimular os microorganismos com potencial de utilização do composto, como fonte de nutrientes, com vantagem seletiva em detrimento aos outros microorganismos que abundam naquele solo.

Um problema que surge no enriquecimento de solos é a toxicidade, insolubilidade em água, volatilidade das substâncias xenobióticas. Os meios de cultura para isolamento geralmente são compostos de uma solução de sais minerais suplementada com o composto xenobiótico em estudo, que é usado como fonte de carbono. Um diagnóstico rápido para identificar biodegradadores é observar a mudança de coloração do meio de cultura ou halo de degradação ao redor das colônias, em função do uso de indicadores ácido-base.

Um exemplo ilustrativo é o herbicida 2,4-D, usando-se o indicador vermelho de bromocresol em um meio de sais minerais com 2,4D como única fonte de carbono e extrato de levedura como fator de crescimento. A oxidação microbiana do 2,4D resulta na produção de HCl, mudando a cor do meio de vermelho (pH 7,0) para amarelo (pH 5,2).

Inicialmente, quando os microorganismos são expostos a um determinado xenobiótico, geralmente há um período inicial de adaptação onde nenhuma mudança é observada. E essa fase de adaptação finaliza quando o início da biodegradação é detectado.

## Referências

Aksu, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review (2005). *Process Biochemistry*, v. 40, p. 997-1026.

Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares. Disponível em: [http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/teses/2011/t\\_luciana\\_ja\\_ndelli\\_gimenes.html](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/teses/2011/t_luciana_ja_ndelli_gimenes.html). Acesso em 06 de maio de 2012.

Castillo MDP, Ander P, Stenström J, Torstensson L. Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in two solid substrate fermentation systems (2000). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (3), 289-295.

Castillo MDP, Von Wirén-Lehr S, Scheunert I, Torstensson L. Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (2001). *Biology and Fertility of Soils*, 33 (6), 521-528.

Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies (2008). *Indian Journal of Microbiology*. 48, 114-127.



Fratila-Apachitei LE, Hirst JA, Siebel MA, Gijzen HJ. Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media (1999). *Biotechnology Letters*, 21, 147–154.

Gaylarde CC, Bellinaso MDL, Manfio GP. Biorremediação: aspectos biológicos e teóricos da biorremediação de xenobióticos (2005). *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, nº 34.

Gianfreda L, Rao MA. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soil: a review (2004). *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 339-354.

Heinfling A, Martínez J, Martínez AT. Transformation of industrial dyes by manganese-independent reaction (1998). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 2788-2793.

Hiratsuka N, Wariishi N, Tanaka H. Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor* (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 563–571.

Masaphy S, Levanon D, Henis Y. Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation (1996). *Bioresource Technology*, 56, 207-214.

Mougin C, Boyer FD, Caminade E, Rama R. Cleavage of the diketone derivative of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases (2000). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10), 4529-4534.

Paschoal, F.M.M.; Tremiliosi-Filho, G. Aplicação da Tecnologia de eletrofloculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais (2005). *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 766-772.

Sindag. Sindicato Nacional da indústria de produtos para defesa agrícola. Dados de mercado, vendas janeiro/outubro 2011. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/dados\\_mercado.php](http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php). Acesso em 9 de maio de 2012.

Uhnáková B, Petříčková A, Biedermann D, Homolka L, Vejvoda V, Bednář P, Papoušková B, Sulc M, Martínková L. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor* (2009). *Chemosphere*, 79 (6), 826-832.