

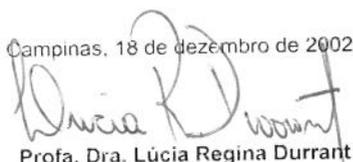


**DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS  
POLICÍCLICOS POR FUNGOS LIGNINOLÍTICOS E SUA APLICAÇÃO  
NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Andréa Roberta Clemente** aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de dezembro de 2002.

Campinas, 18 de dezembro de 2002.



Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant  
Presidente da Banca

Andrea Roberta Clemente

Mestre em Biotecnologia Industrial

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | DC                                  |
| Nº CHAMADA | UNICAMP                             |
|            | C591d                               |
| V          | EX                                  |
| TOMEO BC/  | 53068                               |
| PROC.      | 16-224/03                           |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | R\$ 11,00                           |
| DATA       | 09/10/03                            |
| Nº CPD     |                                     |

CM00181045-4

BIBID. 286511

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C591d Clemente, Andrea Roberta  
 Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos lignolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados / Andrea Roberta Clemente. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Lucia Regina Durrant  
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biotecnologia. 2. Biorremediação. 3. Biosurfactantes.  
 4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. I. Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

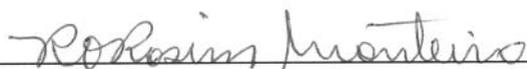
**BANCA EXAMINADORA**



Profª Drª Lucia Regina Durrant  
(orientadora)



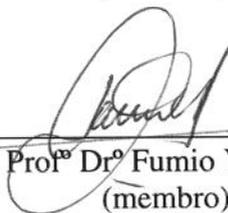
Profª Drª Tânia Akiko Anazawa  
(membro)



Profª Drª Regina T. R. Monteiro  
(membro)



Profª Drª Doralice S. L. Balan  
(membro)



Profº Drº Fumio Yokoya  
(membro)

Profº Drº Marcos Roberto de Vasconcelos Lanza  
(membro suplente)

Profº Drº Itamar Soares de Melo  
(membro suplente)

200311162

*Aos meus pais e avó,  
Por tudo, pela minha vida e todo o amor.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> **Lucia** pela orientação sempre presente, pela confiança, amizade, paciência e ensinamentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro indispensável à realização desta pesquisa.

Aos professores da banca, **Doralice, Fumio, Itamar, Marcos, Regina e Tânia** pelas sugestões.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela infra-estrutura oferecida para realização do meu trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca e da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimento, UNICAMP, pela atenção.

A toda minha família, em especial aos meus sobrinhos **Giovane e Pietra**.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e aos meus amigos:

*“Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho. Algumas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem, mas outras apenas vemos entre um passo e outro. A todas elas chamamos de amigos. Há muitos tipos de amigos. Talvez cada folha de uma árvore caracterize um deles. O primeiro que nasce do broto é o amigo pai e o amigo mãe. Mostram o que é ter vida. Depois vem o amigo irmão, com quem dividimos nosso espaço para que floresça como nós. Mas o destino nos apresenta outros amigos, os quais não sabíamos que iriam cruzar o nosso caminho. Muitos desses são denominados amigos do coração (Ani, Arlete, Débora, Eliane, Érika, Fabiana, Gabriela, Hamilton, Ísis, Luciana, Márcia, Rose). São sinceros, verdadeiros. Sabem quando estamos bem, costumam colocar muitos sorrisos em nossas faces, durante o tempo em que estamos perto. Falando em perto, não podemos esquecer dos amigos distantes, aqueles que ficam nas pontas dos galhos, mas quando o vento sopra, sempre aparecem entre uma folha e outra. O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras*

*permanecem por muitas estações. Mas as que caíram continuam por perto, continuam alimentando a nossa raiz com alegria. Lembranças de momentos maravilhosos enquanto cruzaram o nosso caminho. Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si, e leva um pouco de nós. Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida. É a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso”.*

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| <i>LISTA DE TABELAS</i> -----   | ix   |
| <i>LISTA DE FIGURAS</i> -----   | x    |
| <i>RESUMO</i> -----   | xvi  |
| <i>ABSTRACT</i> -----   | xvii |
| <br>  |      |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> -----  | 1    |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> -----   | 3    |
| <b>2.1. Histórico</b> -----   | 3    |
| <b>2.2. Propriedades Gerais dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos</b> ----- | 3    |
| <b>2.3. Toxicidade dos Haps</b> -----   | 4    |
| <b>2.4. Biodegradação de HAPs</b> -----   | 6    |
| <b>2.5. Fatores Ambientais que Afetam o Metabolismo dos HAPs</b> -----            | 7    |
| <b>2.6. HAPs em Alimentos</b> -----   | 11   |
| <b>2.7. Biosurfactantes</b> -----   | 13   |
| <b>2.8. Ácido Úmico</b> -----   | 14   |
| <b>2.9. Enzimas Ligninolíticas</b> -----  | 16   |
| 2.9.1. Peroxidases-----   | 18   |
| 2.9.2. Polifenol Oxidases-----  | 21   |
| 2.9.3. Enzimas Produtoras De Peróxido De Hidrogênio-----                          | 23   |
| <b>2.10. Citocromo P-450</b> -----  | 24   |
| <b>3. OBJETIVOS</b> -----   | 27   |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> -----  | 28   |
| <b>4.1. Microrganismos Utilizados</b> -----                                       | 28   |
| <b>4.2. Preparo do Inóculo</b> -----  | 28   |
| <b>4.3. Preparo do meio de Crescimento</b> -----                                  | 28   |
| <b>4.4. Adição das Fontes de Carbono</b> -----                                    | 29   |
| <b>4.5. Estudo do Efeito do Inóculo na Biodegradação de HAPs</b> -----            | 29   |
| <b>4.6. Identificação das Linhagens</b> -----                                     | 30   |

|  |    |
|--|----|
| 4.6.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)-----  | 30 |
| 4.6.1.1. Fixação das Células -----   | 30 |
| 4.6.1.2. Desidratação das Amostras e Incorporação de CO <sub>2</sub> -----                               | 30 |
| 4.6.1.3. Aumento da Condutividade Elétrica das Amostras por Impregnação de Átomos Metálicos de Ouro----- | 31 |
| 4.6.1.4. Análise Morfológica das Espécies-----   | 31 |
| 4.6.2. Técnica do Microcultivo-----  | 31 |
| <b>4.7. Determinação da Concentração Máxima de HAP Capaz de Inibir o Crescimento</b> -----               | 31 |
| 4.7.1. Adição das diferentes Concentrações dos HAPs-----   | 32 |
| 4.7.2. Determinação da massa Seca-----   | 32 |
| <b>4.8. Estudo da Degradação de HAPs Utilizando-se os Inóculos Seleccionados</b> ----                    | 32 |
| <b>4.9. Efeito da Adição de Ácido Húmico na Biodegradação dos HAPs</b> -----                             | 33 |
| 4.9.1. Estudo da Descoloração do Ácido Húmico-----   | 33 |
| <b>4.10. Obtenção do Sobrenadante</b> -----  | 33 |
| <b>4.11. Determinação de Proteína Micelial</b> -----   | 33 |
| <b>4.12. Determinação da Produção de Surfactantes</b> -----  | 34 |
| <b>4.13. Determinação das Enzimas Ligninolíticas</b> -----   | 34 |
| <b>4.14. Determinação de Citocromo de P-450 em Toda a Célula</b> -----                                   | 36 |
| <b>4.15. Análise dos Compostos Degradados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> -----  | 37 |
| 4.15.1. Extração dos HAPs para Análise em CLAE-----  | 37 |
| 4.15.2. Condições Cromatográficas-----   | 37 |
| 4.15.3. Preparo da Curva de Calibração-----  | 37 |
| <b>4.16. Estudo da Degradação de Solos Contaminados por HAPs</b> -----                                   | 38 |
| 4.16.1. Preparo do Pré Inóculo-----  | 39 |
| 4.16.2. Preparo da Solução Estoque de HAPs para Estudos com Solo-----                                    | 39 |
| 4.16.3. Extração dos HAPs do Solo para Análise de Degradação-----  | 39 |
| <b>4.17. Caracterização Química e Física do Solo</b> -----   | 40 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> -----  | 41 |
| <b>5.1. Estudo do Efeito do Inóculo na Biodegradação de HAPs</b> -----                                   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| <b>5.2. Identificação das Linhagens Utilizadas neste Trabalho</b> -----                     | 48 |
| 5.2.1. Linhagem 710-----  | 48 |
| 5.2.1.1. Características Macroscópicas-----   | 48 |
| 5.2.1.2. Característica Microscópica-----   | 48 |
| 5.2.2. Linhagem 870-----  | 50 |
| 5.2.2.1. Características Macroscópicas-----   | 50 |
| 5.2.2.2. Característica Microscópica-----   | 50 |
| 5.2.3. Linhagem 898-----  | 52 |
| 5.2.3.1. Características Macroscópicas-----   | 52 |
| 5.2.3.2. Característica Microscópica-----   | 52 |
| 5.2.4. Linhagem 984-----  | 54 |
| 5.2.4.1. Características Macroscópicas-----   | 54 |
| 5.2.4.2. Característica Microscópica-----   | 54 |
| 5.2.5. Linhagem 1040-----   | 56 |
| 5.2.5.1. Características Macroscópicas-----   | 56 |
| 5.2.5.2. Característica Microscópica-----   | 56 |
| <b>5.3. Efeito da Concentração dos HAPs no Crescimento Fúngico</b> -----                    | 59 |
| 5.3.1. Determinação da Massa Seca-----  | 59 |
| 5.3.2. Proteína Micelial-----   | 65 |
| 5.3.2.1. Adição do Naftaleno Juntamente com o Inóculo ou no 3º Dia de Cultivo---            | 65 |
| 5.3.2.2. Adição do Antraceno Juntamente com o Inóculo ou no 3º Dia de Cultivo--             | 66 |
| 5.3.2.3. Adição do Pireno Juntamente com o Inóculo ou no 3º Dia de Cultivo -----            | 68 |
| 5.3.2.4. Adição do Benzo[a]pireno Juntamente com o Inóculo ou no 3º Dia de<br>Cultivo ----- | 69 |
| <b>5.4. Estudo da Degradação de HAPs</b> -----  | 72 |
| 5.4.1. Adição do naftaleno-----   | 72 |
| 5.4.1.1. Com o Inóculo-----   | 72 |
| 5.4.1.2. No 3º Dia de Crescimento-----  | 75 |
| 5.4.2. Adição do Antraceno-----   | 78 |
| 5.4.2.1. Com Inóculo-----   | 78 |

|  |            |
|--|------------|
| 5.4.2.2. No 3º Dia de Crescimento-----                                   | 82         |
| 5.4.3. Adição de Pireno-----   | 86         |
| 5.4.3.1. Com Inóculo-----  | 86         |
| 5.4.3.2. No 3º Dia de Crescimento-----                                   | 90         |
| 5.4.4. Adição de Benzo[a]pireno-----                                     | 95         |
| 5.4.4.1. Com Inóculo-----  | 95         |
| 5.4.4.2. No 3º Dia de Crescimento-----                                   | 99         |
| <b>5.5. Efeito da Adição de Ácido Húmico na Degradação dos HAPs-----</b> | <b>107</b> |
| 5.5.1. Naftaleno-----  | 107        |
| 5.5.2. Antraceno-----  | 112        |
| 5.5.3. Pireno-----   | 116        |
| 5.5.4. Benzo[a]pireno-----   | 121        |
| <b>5.6. Estudo da Degradação de Solos Contaminados por HAPs-----</b>     | <b>128</b> |
| 5.6.1. Naftaleno-----  | 128        |
| 5.6.2. Antraceno-----  | 130        |
| 5.6.3. Pireno-----   | 132        |
| 5.6.4. Benzo[a]pireno-----   | 134        |
| <b>6. CONCLUSÕES GERAIS-----</b>   | <b>137</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>                                | <b>140</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>TABELA 1.</b> Composição do meio líquido base em 1000 mL de água destilada-----   | 29  |
| <b>TABELA 2:</b> Análise Química do Solo-----  | 40  |
| <b>TABELA 3:</b> Teor de Umidade do Solo-----  | 40  |
| <b>TABELA 4:</b> Granulometria do Solo-----  | 40  |
| <b>TABELA 5:</b> Efeito do tamanho do inóculo na degradação de naftaleno (0,5%)<br>com 5 e 10 dias de crescimento-----               | 41  |
| <b>TABELA 6:</b> Degradação de antraceno (0,1%), com variação no tamanho de inóculo, com<br>5 e 10 dias de crescimento-----          | 43  |
| <b>TABELA 7:</b> Degradação de pireno (0,05%), com 5 e 10 dias de crescimento, com<br>diferentes tamanhos de inóculo-----            | 44  |
| <b>TABELA 8:</b> Degradação de benzo[a]pireno (0,05%), com diferentes quantidades de<br>inóculo, com 5 e 10 dias de crescimento----- | 45  |
| <b>TABELA 9:</b> Seleção do melhor tamanho de inóculo na degradação dos HAPs-----  | 46  |
| <b>TABELA 10:</b> Seleção de melhor inóculo e dia de degradação produzida pelas linhagens<br>nos diferentes HAPs-----                | 103 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 1.</b> Estrutura química de HAPs. * Prioridade da EPA-----  | 5  |
| <b>FIGURA 2:</b> Vias metabólicas para o catabolismo microbiano-----  | 11 |
| <b>FIGURA 3:</b> Estrutura química de ácidos húmicos .-----   | 15 |
| <b>FIGURA 4:</b> Ciclo catalítico da lignina peroxidase.-----   | 19 |
| <b>FIGURA 5:</b> Ciclo catalítico da manganês peroxidase.-----  | 20 |
| <b>FIGURA 6:</b> Representação de uma reação catalisada por lacase.-----  | 21 |
| <b>FIGURA 7:</b> Esquema representativo da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extracelular, através da atuação das enzimas Aril-Álcool-Oxidase, Aril-Álcool-Desidrogenase e Aril-Áldeído-Desidrogenase ----- | 24 |
| <b>FIGURA 8:</b> Ciclo catalítico do sistema enzimático P-450.-----   | 26 |
| <b>FIGURA 9:</b> Linhagem <i>Acremonium</i> sp (710). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo.-----   | 49 |
| <b>FIGURA 10:</b> Linhagem <i>Trichoderma</i> sp (870). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo-----  | 51 |
| <b>FIGURA 11:</b> Linhagem <i>Fusarium</i> sp (898). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo-----   | 53 |
| <b>FIGURA 12:</b> Linhagem <i>Aspergillus</i> sp (984). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo-----  | 55 |
| <b>FIGURA 13:</b> Linhagem <i>Verticillium</i> sp (1040). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo.-----   | 57 |
| <b>FIGURA 14.</b> Massa seca produzida por <i>Acremonium</i> sp utilizando-se como substrato os HAPs nas diferentes concentrações.-----   | 59 |
| <b>FIGURA 15.</b> Massa seca produzida pelo fungo <i>Trichoderma</i> sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações. -----   | 60 |
| <b>FIGURA 16.</b> Massa seca produzida pelo fungo <i>Fusarium</i> sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações-----  | 61 |
| <b>FIGURA 17.</b> Massa seca produzida pelo fungo <i>Aspergillus</i> sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações-----   | 62 |
| <b>FIGURA 18.</b> Massa seca produzida pelo fungo <i>Verticillium</i> sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações-----  | 63 |
| <b>FIGURA 19:</b> Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em naftaleno 0,5%-----  | 65 |

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 20:</b> Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em antraceno 0,1%-----  | 67 |
| <b>FIGURA 21:</b> Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em pireno 0,05%-----  | 68 |
| <b>FIGURA 22:</b> Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em benzo[a]pireno 0,05%.-----   | 70 |
| <b>FIGURA 23:</b> Atividades ligninolíticas após crescimento das linhagens em naftaleno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. Lacase.-----               | 72 |
| <b>FIGURA 24:</b> Atividade de biosurfactante produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono, adicionado junto com o inóculo.-----                             | 73 |
| <b>FIGURA 25:</b> Degradação de naftaleno produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno, adicionado junto com o inóculo.---   | 74 |
| <b>FIGURA 26:</b> Atividades ligninolíticas após crescimento das linhagens em naftaleno como fonte de carbono, adicionado no 3º dia de cultivo. A. LiP; B. MnP; C. Lacase.-----               | 75 |
| <b>FIGURA 27:</b> Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono, adicionado no 3º dia de cultivo.-----    | 76 |
| <b>FIGURA 28:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono, adicionado no 3º dia de cultivo.-----       | 77 |
| <b>FIGURA 29:</b> Degradação de naftaleno, adicionado no 3º dia de cultivo, produzida pelas linhagens.-----   | 78 |
| <b>FIGURA 30:</b> Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em antraceno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.-----          | 79 |
| <b>FIGURA 31:</b> Atividade de biosurfactante por aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.----- | 80 |
| <b>FIGURA 32:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.-----      | 81 |
| <b>FIGURA 33:</b> Degradação de antraceno, adicionado junto com o inóculo, produzida pelas linhagens fúngicas.-----   | 82 |

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 34:</b> Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em antraceno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.-----                         | 83 |
| <b>FIGURA 35:</b> Atividade de biosurfactante por aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono.-----                | 84 |
| <b>FIGURA 36:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono.-----                     | 85 |
| <b>FIGURA 37:</b> Degradação de antraceno, adicionado no 3° dia de cultivo, produzida pelas linhagens fúngicas.-----  | 86 |
| <b>FIGURA 38:</b> Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.-----                             | 87 |
| <b>FIGURA 39:</b> Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.-----                       | 88 |
| <b>FIGURA 40:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.-----                         | 89 |
| <b>FIGURA 41:</b> Degradação de pireno, adicionado junto com o inóculo, produzida pelas linhagens fúngicas.-----  | 90 |
| <b>FIGURA 42:</b> Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.-----                            | 91 |
| <b>FIGURA 43:</b> Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono.-----                      | 92 |
| <b>FIGURA 44:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo, (emulsão água em óleo) produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono.----- | 93 |
| <b>FIGURA 45:</b> Degradação de pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, produzida pelas linhagens fúngicas.-----   | 94 |
| <b>FIGURA 46:</b> Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.-----                     | 95 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>FIGURA 47:</b> Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.-----  | 96  |
| <b>FIGURA 48:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.-----  | 97  |
| <b>FIGURA 49:</b> Degradação de benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, produzida pelas linhagens fúngicas.-----   | 98  |
| <b>FIGURA 50:</b> Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens crescidas em benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.-----   | 99  |
| <b>FIGURA 51:</b> Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono.-----   | 100 |
| <b>FIGURA 52:</b> Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia, como fonte de carbono.-----  | 101 |
| <b>FIGURA 53:</b> Degradação de benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia de cultivo, produzida pelas linhagens fúngicas.-----  | 102 |
| <b>FIGURA 54:</b> Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. -----  | 107 |
| <b>FIGURA 55:</b> Atividade de biosurfactante produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. -----   | 108 |
| <b>FIGURA 56:</b> Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo. ----- | 109 |
| <b>FIGURA 57:</b> Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.-----        | 110 |
| <b>FIGURA 58:</b> Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. -----  | 111 |
| <b>FIGURA 59:</b> Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono. -----  | 112 |
| <b>FIGURA 60:</b> Atividade de biosurfactante das linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono-----   | 113 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>FIGURA 61:</b> Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo. -----      | 114 |
| <b>FIGURA 62:</b> Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.-----             | 115 |
| <b>FIGURA 63:</b> Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono. -----   | 116 |
| <b>FIGURA 64:</b> Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono. -----  | 117 |
| <b>FIGURA 65:</b> Atividade de biosurfactante das linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono.-----  | 118 |
| <b>FIGURA 66:</b> Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo. -----         | 119 |
| <b>FIGURA 67:</b> Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.-----                | 120 |
| <b>FIGURA 68:</b> Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono. -----  | 121 |
| <b>FIGURA 69:</b> Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. -----  | 122 |
| <b>FIGURA 70:</b> Atividade de biosurfactante das linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. -----   | 123 |
| <b>FIGURA 71:</b> Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo. ----- | 124 |
| <b>FIGURA 72:</b> Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.-----        | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>FIGURA 73:</b> Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. -----   | 126 |
| <b>FIGURA 74:</b> Degradação de naftaleno em solo autoclavado e não autoclavado.-----  | 128 |
| <b>FIGURA 75:</b> Cromatogramas das linhagens após 8 semanas de crescimento,utilizando naftaleno como substrato. A. Controle; B. <i>Aspergillus</i> sp (984); C. <i>Verticillium</i> sp (1040)-----      | 129 |
| <b>FIGURA 76:</b> Degradação de antraceno em solo autoclavado e não autoclavado.-----  | 130 |
| <b>FIGURA 77:</b> Cromatogramas das linhagens após 8 semanas de crescimento,utilizando antraceno como substrato. A. Controle; B. <i>Aspergillus</i> sp (984); C. <i>Verticillium</i> sp (1040).-----     | 131 |
| <b>FIGURA 78:</b> Degradação de pireno em solo autoclavado e não autoclavado.---   | 132 |
| <b>FIGURA 79:</b> Cromatogramas das linhagens após 8 semanas de crescimento,utilizando pireno como substrato. A. Controle; B. <i>Aspergillus</i> sp (984); C. <i>Verticillium</i> sp (1040)-----         | 133 |
| <b>FIGURA 80:</b> Degradação de benzo[a]pireno em solo autoclavado e não autoclavado.-----   | 134 |
| <b>FIGURA 81:</b> Cromatogramas das linhagens após 6 semanas de crescimento,utilizando benzo[a]pireno como substrato. A. Controle; B. <i>Aspergillus</i> sp (984); C. <i>Verticillium</i> sp (1040)----- | 135 |

## RESUMO

Utilizou-se cinco linhagens fúngicas não identificadas (710, 870, 898, 984 e 1040), doadas pela Fundação Tropical André Toselo. Assim, a seguinte identificação para tais linhagens, *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898), *Aspergillus* sp (984) e *Verticillium* sp (1040), foi proposta, após visualização das características macroscópicas e microscópicas. Utilizou-se como fonte de carbono principal os seguintes HAPs: naftaleno (0,5%), antraceno (0,1%), pireno (0,05%) e benzo[a]pireno (0,05%). As linhagens cresceram em meio líquido onde variou-se o tamanho do inóculo, para verificar o efeito deste na biodegradação dos compostos. Micélio de 1 cm<sup>2</sup> contendo esporos, foi utilizado como inóculo, onde foi adicionado pedaços de 1 cm<sup>2</sup>, 2 x 1 cm<sup>2</sup> e 3 x 1 cm<sup>2</sup> ao meio líquido base contendo os HAPs. Após 5 e 10 dias de cultivo os sobrenadantes foram coletados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A melhor degradação (30,0 – 65,0%), para naftaleno, antraceno e pireno, foi obtida quando o micélio de 1 cm<sup>2</sup> foi utilizado como inóculo. Entretanto para benzo[a]pireno (81,0 - 87,0 %), foi na presença de inóculo de 3 x 1 cm<sup>2</sup>. Observou-se também que aumentando-se a concentração dos HAPs (adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo), ocorreu uma diminuição ou completa inibição do crescimento das linhagens, principalmente quando adicionado juntamente com o inóculo. Após seleção do melhor tamanho de inóculo para biodegradação, as linhagens foram crescidas nos HAPs e incubadas por um período de 30 dias, retirando-se amostras com 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 dias de cultivo. Após esse período foi determinado a produção das enzimas ligninolíticas, biosurfactantes, citocromo P-450 (cit P-450) e degradação. As linhagens foram capazes de crescer e degradar os HAPs, mesmo os mais complexos como pireno e benzo[a]pireno, sendo que a porcentagem de degradação, produção de enzimas ligninolíticas, produção de cit P-450 e biosurfactantes, variou de acordo com a linhagem, fonte de carbono e dia de crescimento. Para todas as quatro fontes de carbono utilizadas os melhores resultados foram quando da adição dos compostos no 3º dia de cultivo e a enzima ligninolítica manganês-peroxidase (MnP) foi a enzima predominante. Com o tamanho do inóculo e o melhor período de biodegradação selecionados, verificou-se o efeito da ação de ácido húmico na degradação dos HAPs. Para tanto as linhagens foram crescidas no meio de cultivo, onde os HAPs foram adicionados ao meio somente no 3º dia do crescimento fúngico, e o ácido húmico (0,01%) foi adicionado ao meio tanto junto com o inóculo como no 3º dia de crescimento. Observou-se que a degradação dos HAPs foi menor, podendo ser devido ao fato das linhagens primeiramente utilizarem o ácido húmico como substrato e não os HAPs. A degradação de HAPs em solo pelas linhagens 984 (*Aspergillus* sp) e 1040 (*Aticilium* sp), foi também determinada, e para isso contaminou-se o solo com os HAPs na concentração de 5 mg de naftaleno g<sup>-1</sup> de solo; 1,0 mg de antraceno g<sup>-1</sup> de solo e 0,5 mg de pireno e/ou benzo[a]pireno g<sup>-1</sup> de solo. Estas linhagens foram inoculadas em 2 porções de solo, uma autoclavada e outra não autoclavada, cultivando-se por um período de 2, 4, 6 e 8 semanas. Após esse período os HAPs foram extraídos do solo e verificou-se a degradação por CLAE. Verificou-se que as linhagens apresentaram comportamento diferente quando inoculadas no solo autoclavado e não autoclavado e também quando se variou o substrato.

## ABSTRACT

The five fungal strains used in this work, namely 710, 870, 898, 984 and 1010, were a gift from Fundação Tropical André Toselo, and were isolated from soil samples collected at the Jureia-Itatins Ecological Reserve. Following microscopically examinations these strains were classified as *Acremonium* sp. (710), *Trichoderma* sp. (870), *Fusarium* sp. (898), *Aspergillus* sp. (984) and *Verticillium* sp. (1040). The following Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): naphthalene (0,5%), anthracene (0,1%), pyrene (0,05%) and benzo[a]pyrene (0,05%), were used throughout this work, as the carbon source. These fungi were grown in liquid medium with varying inoculum amounts, to determine the effect of the size of the inoculum on the biodegradation of the PAHs. Pieces of mycelia of 1cm, 2x1 cm<sup>2</sup> and 3x1cm<sup>2</sup> were used for each PAH and after 5 and 10 days of cultivation the supernatants were collected and degradation was determined by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). The best degradation (30.0 – 65.0%), for naphthalene, anthracene and pyrene, were obtained when the inoculum size used was 1 cm<sup>2</sup>. However, for benzo[a]pyrene, the best degradation (81.0 – 87.0%), was achieved with 3 x 1cm<sup>2</sup> mycelium pieces. It was also observed that increasing the concentration of the PAHs (added together with the inoculum or on the 3rd day of each fungal growth), a reduction on growth or complete inhibition of growth occurred. This negative effect on growth was more accentuated when the PAHs were added together with the inoculum. The strains were then cultivated in the PAHs, added on the 3<sup>rd</sup> day of growth, and incubated for a total period of 33 days, with samples consisting of duplicates of Erlenmeyer flasks collected on days 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 and 30. The presence of ligninolytic enzymes, biosurfactants, cytochrome P-450 (cit P450) and the degradation of the PAHs were determined. The results showed that the strains were able to grow and degrade the PAHs, as complex as pyrene and benzo[a]pyrene, and the percentage of degradation, the production of ligninolytic enzymes, cit P-450 and biosurfactants, varied with the strain, the carbon source and with the day of growth. Manganese-peroxidase was the predominant enzyme produced by the five fungi. The effect of humic acid on biodegradation the PAHs was determined in liquid medium where the PAHs were added on the third day of growth and the humic acid (0.01%) was added together with the inoculum or and on the third day of growth. A decrease on the degradation of the PAHs was observed, and it is suggested that the strains used the humic acid preferentially to the PAHs. The degradation of PAHs in soil contaminated with the PAHs (5 mg naphthalene/g soil; 1,0 mg anthracene/g soil and 0,5 mg pyrene and/or benzo[a]pyrene/g soil), was verified using the fungal strains 984 and 1040. These strains were inoculated into two portions of soil, sterilized and non-sterilized, and cultivated for 2, 4, 6, and 8 weeks, when the PAHs were extracted from the soil and the degradation was determined by HPLC. Degradation varied with the strains and also with the soil treatment.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são um grupo de compostos formados durante a combustão incompleta de material orgânico, como no caso da queima da madeira e de óleos combustíveis.

Desde o início da revolução industrial, uma grande variedade de poluentes aromáticos, vêm sendo introduzidos no ambiente pelas atividades antropogênicas. A persistência desses compostos no meio ambiente tem causado grande alarme público devido à toxicidade, mutagenicidade e bioacumulação em organismos superiores (LIVINGSTONE, 1993).

O problema dos compostos recalcitrantes está relacionado com a bioconcentração e conseqüente biomagnificação de muitas moléculas xenobióticas. Compostos xenobióticos podem ser definidos como compostos liberados no meio ambiente pela ação humana. O interesse por este estudo começou quando muitas moléculas orgânicas sintetizadas pelo homem tornaram-se persistentes no meio ambiente (MÜLLER, 1992). Este fenômeno é responsável pela alta concentração de compostos orgânicos lipofílicos e persistentes encontrados nos organismos, especialmente naqueles presentes no topo da cadeia alimentar. A toxicidade associada com estes compostos tem levado a um questionamento público, especialmente no caso dos pesticidas, que foram indiscriminadamente utilizados (LIVINGSTONE, 1993).

A contaminação de alimentos por HAPs se deve principalmente à poluição do ar e da água, à sua presença em solos e sedimentos e a certos tipos de processamento como defumação, torrefação e secagem pelo calor de combustão direta da madeira, que contaminam, por exemplo, carnes, queijos, grãos, cereais, café e óleos vegetais (CAMARGO, 2000).

A biorremediação, ou seja, a utilização de microrganismos na degradação de poluentes ambientais e no tratamento de rejeitos agroindustriais está emergindo como uma tecnologia alternativa para remoção de poluentes do meio ambiente, restaurando lugares contaminados e prevenindo a recontaminação. O uso de técnicas de remediações incluem remoção ou incineração do local contaminado ou "land-filling". Estas técnicas são pouco aceitas, pois o custo é alto e o meio ambiente pode sofrer com esses tratamentos. Por isso a biorremediação é uma alternativa para a descontaminação desses locais (CANET et al.,2001).

O principal objetivo do estudo do metabolismo de xenobióticos é a utilização de microrganismos para remoção de poluentes tóxicos de ambientes naturais por meio da biodegradação. Os fatores ambientais são limitantes para o metabolismo microbiano e o propósito da biorremediação é otimizar estes fatores para que a mineralização ocorra mais facilmente (DAUDABARAS & CHAKRABARTY, 1992).

A utilização da tecnologia aplicada na biorremediação tem se intensificado consideravelmente devido a sua alta eficiência, baixo custo e mínima agressividade ambiental, quando comparada com processos físicos e químicos (SHELTON et al., 1996).

Alguns microrganismos como os fungos são capazes de degradar a lignina e compostos estruturalmente relacionados pela produção de enzimas extracelulares como lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP) e lacases; e de enzimas ligadas à membrana como as enzimas da família do citocromo P-450. O mecanismo exato pelo qual os polímeros de lignina são despolimerizados e mineralizados não é completamente conhecido. Sendo a lignina um polímero com ligações aleatórias, o sistema envolvido em sua degradação, deve também agir não especificamente. Assim, não é surpresa que o sistema ligninolítico destes fungos também atuem em uma grande variedade de poluentes aromáticos (BUMPUS et al., 1985; BUMPUS & AUST, 1987; AUST, 1990; GONZALEZ, 1990; PICKARD et al., 1999; CAMERON et al., 2000). Estudos na biodegradação de HAPs tem utilizado fungos de decomposição branca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*. Esses fungos conseguem degradar HAPs com cinco anéis aromáticos e descontaminar solos e sedimentos poluídos com estes compostos. Fungos não ligninolíticos, como *Cunninghamella elegans*, *Penicillium janthinellum* e *Syncephalastrum* sp, podem transformar uma variedade de HAPs, incluindo pireno, criseno e benzo[a]pireno para metabólitos polar (BARCLAY, et al., 1995; ANDERSOM & HENRYSSON, 1996; KIEHLMANN et al., 1996; WUNDER et al., 1997; BOONCHAN et al., 2000).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. HISTÓRICO**

O médico inglês, Percival Pott, em 1975 observou que os limpadores de chaminés apresentavam alta incidência de câncer de próstata (IARC, 1985). Cientistas japoneses, em 1912, observaram que o alcatrão da hulha aplicado em orelhas de coelhos e camundongos induzia à formação de tumores malignos. Estas observações estimularam os estudos químicos e toxicológicos do alcatrão, possibilitando a descoberta dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (BARTLE, 1991).

Na década de 30, foi isolado do alcatrão o benzo[a]pireno. Este hidrocarboneto, devido ao seu elevado potencial carcinogênico, passou a ser o composto mais estudado dentre os HAPs e tem sido utilizado como um indicador arbitrário da contaminação de diferentes tipos de alimentos por outros hidrocarbonetos (ROE, 1993; WALLER, 1994).

### **2.2. PROPRIEDADES GERAIS DOS HAPs**

Os compostos aromáticos são a segunda família de constituintes orgânicos mais abundantes presentes na biosfera, depois dos carboidratos. As fontes naturais mais importantes desses compostos são polímeros pobremente biodegradáveis como lignina, taninos condensados, humus e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (FIELD et al.,1993).

Os HAPs representam uma classe de compostos orgânicos constituídos de anéis de benzeno unidos, e que são comuns em produtos e sub-produtos do carvão. Eles são poluentes de ampla distribuição na atmosfera sendo relativamente resistentes à biodegradação, podendo se acumular em níveis substanciais no ambiente. Uma vez que alguns HAPs são carcinogênicos, a presença no meio ambiente desses compostos, pode apresentar um perigo potencial à saúde. Há mais de 70 compostos classificados como HAPs contendo 2 ou mais anéis aromáticos, sendo encontrados em uma grande variedades de solos e sedimentos. Quantidades significativas estão presentes em efluentes industriais e domésticos, podendo causar problemas no tratamento de águas. Outra fonte é o derramamento de hidrocarbonetos; as frações aromáticas e alifáticas mais biodegradáveis são removidas, deixando as frações mais resistentes, as quais incluem os HAPs e podendo submergir e se tornarem poluentes permanentes de oceanos, lagos e rios. Os HAPs são produzidos em grandes quantidades a partir de operações de cozimento e processos de

gaseificação usando carvão e a partir de outras fontes de combustão incompleta como de fumaças de veículos, queima de lixo e emissão industrial. Estes compostos também podem ter origem natural em depósitos de carvão, a partir de aromáticos naturais como os terpenos, esteróides e quinonas de plantas as quais se volatilizam e se condensam com os HAPs. As ligninas também podem progressivamente se decompor à substâncias húmicas e estas se tornam abundantes durante o processo de maturação do carvão ou depósito de carvão, podendo eventualmente produzir HAPs. Assim, os HAPs são principalmente de origem antropogênica, mas também têm origens geológica e biológica natural (FREEMAN & CATELL, 1990; HIGSON, 1991; GERIN et al., 1993).

Os HAPs apresentam elevada solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (ANDELMAN & SUESS, 1970). No entanto, na presença de outros compostos orgânicos e de detergentes aniônicos, a solubilidade em água pode aumentar facilitando sua mobilidade para o meio ambiente e passagem para a cadeia alimentar (LO & SANDI, 1978; CAMARGO, 2000).

### **2.3. TOXICIDADE DOS HAPs**

Os HAPs são substâncias potencialmente carcinogênicas, que pertencem à classe dos pró-carcinogênicos, necessitando de ativação metabólica para formar o carcinógeno ativo (IARC, 1983; SHIELDS, 1993; VON SZENTPLAY & SHAMOVSKY, 1995).

Os HAPs liberados no meio ambiente encontram-se em uma mistura complexa. Dezesesseis compostos (Fig. 1), tem sido identificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos “USEPA”, devido a sua toxicidade, mutagenicidade e características carcinogênicas (VARANASI, 1989).

Duas classes de HAPs podem ser diferenciadas baseando-se nas suas propriedades e massa molar:

1. HAPs de baixa massa molar com dois ou três anéis aromáticos e,
2. HAPs de alta massa molar com quatro ou mais anéis aromáticos.

A primeira classe não apresenta toxicidade significativa, enquanto na segunda classe encontram-se HAPs com potencial carcinogênico (BUDZINSKI, *et al.*, 1997; TRAPIDO, 1999; YANG, 2000)

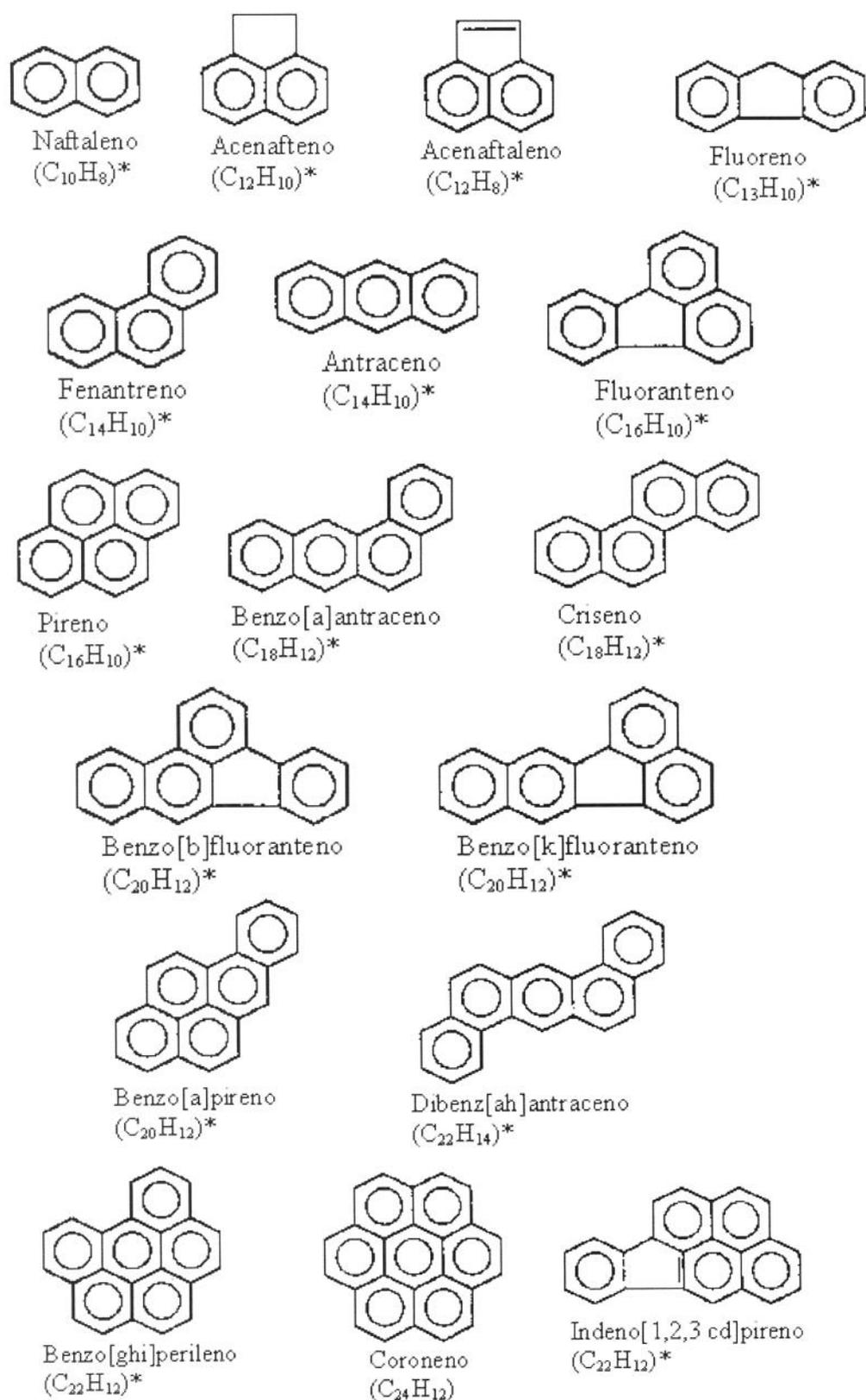


FIGURA 1. Estrutura química de HAPs. \* Prioridade da EPA

## **2.4. BIODEGRADAÇÃO DE HAPs**

Os HAPs são compostos hidrofóbicos e sua persistência no meio ambiente ocorre devido principalmente à baixa solubilidade em água. Eles se associam rapidamente aos sedimentos, onde tornam-se resistentes até serem degradados (HITES et al., 1977; MEANS et. al., 1980). A lipofilicidade, persistência ambiental e genotoxicidade aumentam com o tamanho da molécula (JACOB et al., 1986; MILLER & MILLER, 1981). Estudos têm demonstrado que a degradação microbiana de HAPs é o principal processo de descontaminação de sedimentos e superfícies de solos (SIMS et al., 1990). Esses compostos podem ser totalmente degradados (mineralizados) ou ser parcialmente transformados por uma comunidade de microrganismos ou por um único microrganismo (CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA & HEITKAMP, 1989).

O metabolismo de HAPs por culturas puras de microrganismos e transformações cometabólicas por comunidades microbianas mistas tem sido estudado desde os anos 80. Entretanto, para a biorremediação ser considerada uma tecnologia viável na descontaminação de locais poluídos por HAPs, precisa-se entender mais sobre os microrganismos, processos enzimáticos e as condições ambientais necessárias para a otimização na degradação desses compostos (SINGLETON, 1994). As principais descrições do metabolismo de HAPs estão descritos abaixo:

- Uma grande variedade de bactérias, fungos e algas tem a capacidade de metabolizar HAPs. Geralmente a taxa de degradação destes compostos é inversamente proporcional ao número de anéis da molécula. Assim, HAPs de baixa massa molar são degradados mais facilmente que HAPs de alta massa molar (CERNIGLIA & HEITKAMP, 1989).
- A degradação microbiana de HAPs como naftaleno, fenantreno, antraceno e acenafteno tem sido documentada e as vias bioquímicas elucidadas (CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA et al., 1992). Pouco se conhece sobre os microrganismos capazes de degradar HAPs de alta massa molar utilizando-os como única fonte de carbono e energia (MUELLER et al., 1990; WALTER et al., 1991).
- Os mecanismos de biodegradação, tanto para procarióticos como para eucarióticos, requerem a presença de moléculas de oxigênio para iniciar a degradação enzimática nos anéis de HAPs (CHAPMAN, 1979; GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984). Outros sistemas enzimáticos,

como a metano-oxigenase são também importantes no catabolismo de HAPs (COLBY et al., 1977, 1978; DALTON et al., 1981; VOGEL & GRBIC-GALIC, 1986; GRBIC-GALIC & VOGEL, 1987).

- A degradação microbiana em ambientes aquáticos e terrestres é influenciada fortemente por uma grande variedade de fatores bióticos e abióticos que incluem: temperatura, pH, tipo de solo, aeração, nutrientes, profundidade, adaptação microbiana, exposição prévia ao composto, toxicidade do sedimento, propriedades físico-químicas dos HAPs, concentração destes compostos e fatores sazonais (WANG et al., 1990; MANILAL & ALEXANDER, 1991; ATLAS, 1991).

## **2.5. FATORES AMBIENTAIS QUE AFETAM O METABOLISMO DOS HAPs**

Os fatores ambientais, descritos a seguir, podem afetar a degradação dos xenobióticos de diversas maneiras tais como: inibição do crescimento do microrganismo e disponibilidade do xenobiótico, entre outras:

- pH:

Estudos na degradação de xenobióticos em laboratório são realizados em valores de pH neutro. Como existem muitos ambientes ácidos ou alcalinos, uma grande área de pesquisa pode ser o isolamento de microrganismos que possuam a capacidade de degradar xenobióticos em ambientes que apresentem valores de pH extremos (SINGLETON, 1994).

- Temperatura:

Muitos microrganismos isolados e já estudados degradam os xenobióticos otimamente desde que em temperaturas mesófilas. A capacidade em degradar xenobióticos sob temperaturas superiores ou inferiores à 25°C - 30°C, é restrita. Por isso tenta-se selecionar microrganismos que tenham a capacidade de degradar estes compostos em temperaturas variadas, isto é, diferentes da mesófila (SINGLETON, 1994).

- Biodisponibilidade:

Um dos principais fatores que afetam a biodisponibilidade de xenobióticos é sua sorção na partícula da matéria. A efetiva remoção de um composto da solução pode significar que este não esteja disponível para a degradação. Isto é especialmente importante quando está se considerando a degradação em solos. Uma variedade de fatores, incluindo a interação dos minerais e a matéria orgânica do solo afetam o grau de sorção dos xenobióticos ao solo (ZIERATH et al., 1980; MEANS, et al., 1980). Esta área é complexa, uma vez que os diferentes compostos têm afinidades variadas aos constituintes do solo. Por exemplo, contaminantes orgânicos não iônicos como o naftaleno não é absorvido por superfícies minerais hidratadas, mas interage fortemente com o carbono orgânico. Os microrganismos também apresentam características diferentes, e tem sido demonstrado que, enquanto um xenobiótico pode não estar disponível para um microrganismo, pode estar disponível para outro e assim ser degradado (GUERIN & BOYD, 1992).

Outro fator determinante da biodisponibilidade de uma partícula poluente é sua solubilidade em água, o que sugere que a baixa solubilidade limita o transporte do poluente na célula microbiana, diminuindo efetivamente a sua degradação (MILLER & BARTHA, 1989). Para vencer este problema pode utilizar microrganismos produtores de surfactantes biológicos (biosurfactantes) ou a utilização de surfactantes sintéticos (detergentes), que aumentam a dispersão na fase aquosa dos compostos orgânicos tóxicos e melhoram sua degradação (ZHANG & MILLER, 1992).

- Nutrientes:

Alguns microrganismos conseguem degradar xenobióticos com dois ou três anéis aromáticos, como naftaleno, antraceno e fenantreno utilizando-os como única fonte de carbono. Entretanto não há relatos de microrganismos capazes de degradar xenobióticos com quatro ou mais anéis aromáticos sem a presença de outra fonte de carbono mais facilmente assimilável (CERNIGLIA & CROW, 1981; LAUNEN, et al., 1995).

- Disponibilidade de Oxigênio:

A degradação de xenobióticos pode ocorrer tanto em condições aeróbias como anaeróbias (REINEKE & KNACKMUSS, 1988; EVANS & FUCHS, 1988; NEILSON, 1990; HÄGGBLOOM, 1992). Como pode ocorrer contaminação por estes compostos em várias camadas profundas do solo, onde a concentração de O<sub>2</sub> é limitada, é de se esperar que a procura de microrganismos capazes de degradar xenobióticos sem a presença de oxigênio seja de grande importância.

Vários grupos de pesquisas têm demonstrado que os fungos ligninolíticos de decomposição branca são capazes de degradar HAPs e possuem potencial para a biorremediação de solos e sedimentos contaminados por estes (BUMPUS, 1989; AUST, 1990; CAMERON et al., 2000).

Encontra-se na literatura trabalhos sobre a biodegradação de HAPs por fungos de decomposição branca e os metabólitos formados após esta degradação. O fungo mais estudado, *Phanerochaete chrysosporium*, produziu lignina-peroxidase extracelular que não só degradou compostos relacionados à lignina, mas também catalisou a oxidação envolvendo um elétron de HAPs para quinonas (BUMPUS et al., 1985).

BUMPUS (1989), verificou a habilidade do fungo de decomposição branca *P. chrysosporium* em degradar os HAPs, presentes em óleo de antraceno, fluoreno (54 mg g<sup>-1</sup>), fenantreno (172 mg g<sup>-1</sup>), antraceno (32 mg g<sup>-1</sup>), carbazole (18 mg g<sup>-1</sup>), fluorantreno (74 mg g<sup>-1</sup>) e pireno (37 mg g<sup>-1</sup>), na porcentagem de 98%, 95%, 98%, 98%, 74% e 80%, respectivamente, depois de 27 dias de incubação. Ele relacionou esta degradação com as enzimas ligninolíticas produzidas por este fungo.

BARCLAY et al. (1995), estudando a biodegradação e sorção de HAPs por *P. chrysosporium* observou que a produção de LiP não se correlacionava com a mineralização dos HAPs. Desse modo os autores concluíram que a produção de LiP não está necessariamente envolvida com a biodegradação de todos os HAPs, por este fungo. Um fator significativo na biodegradação destes compostos e/ou desaparecimento destes dos meios de cultura pode ser o fenômeno de sorção.

O antraceno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ , incubado por um período de 28 dias) foi degradado por fungos como *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (92,6%), *Trametes versicolor* ATCC 20869, *Bjerkandera adusta* CBS 595.78, *Ramaria sp.* 158, *Polyporus pinsitus* CBS 678.70, *Trametes sp.* 11, 41, 39, *Agaricales*, *Bjerkandera sp.* 55, *Deadaleopsis confragosa* GM2 e *Stereum sp.* (99,2%). Linhagens do gênero *Bjerkandera*, *Phanerochaete*, *Ramariai* e *Agaricales* converteram eficientemente o antraceno a antraquinona como metabólito final. Linhagens pertencentes ao gênero *Trametes* degradaram antraceno sem acumular antraquinona (FIELD et al., 1992). Os maiores metabólitos de fenantreno são seus derivados monohidroxilados (MÜNCNEROVÁ & AUGUSTIN, 1994).

O fungo não ligninolítico *Cunninghamella elegans* metaboliza HAPs para compostos que são menos mutagênicos que os compostos originais. Embora *C. elegans* inicialmente metabolize HAPs para *trans*-diidrodióis, fenóis, quinonas e epóxis diidrodióis, outros compostos como sulfato glicurônico e conjugados glicosídeos têm sido identificados como produtos de detoxificação destes metabólitos primários (Fig 2). Estudos em laboratórios tem indicado similaridade bem como diferenças entre a oxidação fúngica e mamífera de HAPs. As vias metabólicas fúngicas têm mostrado uma maior tendência para a detoxificação do que para bioativação, que ocorre comumente em mamíferos (CERNIGLIA et al., 1985);

RAVELET et al. (2000), isolaram e identificaram fungos capazes de degradar pireno ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), em meio líquido no período de dois dias. Entre as 41 espécies isoladas, 10 mostraram capacidade de degradar este composto ( $> 2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), sendo dois zigomicetos, 6 deuteromicetos, 1 dematiacea e 1 esfaerosidale. Entre essas linhagens encontram-se 9 que ainda não tinham sido reportadas na literatura e mostraram real valor na biorremediação de HAPs. Esta seleção confirma que a degradação de HAPs por fungos depende muito do seu gênero (KRIVOBOK et al., 1998).

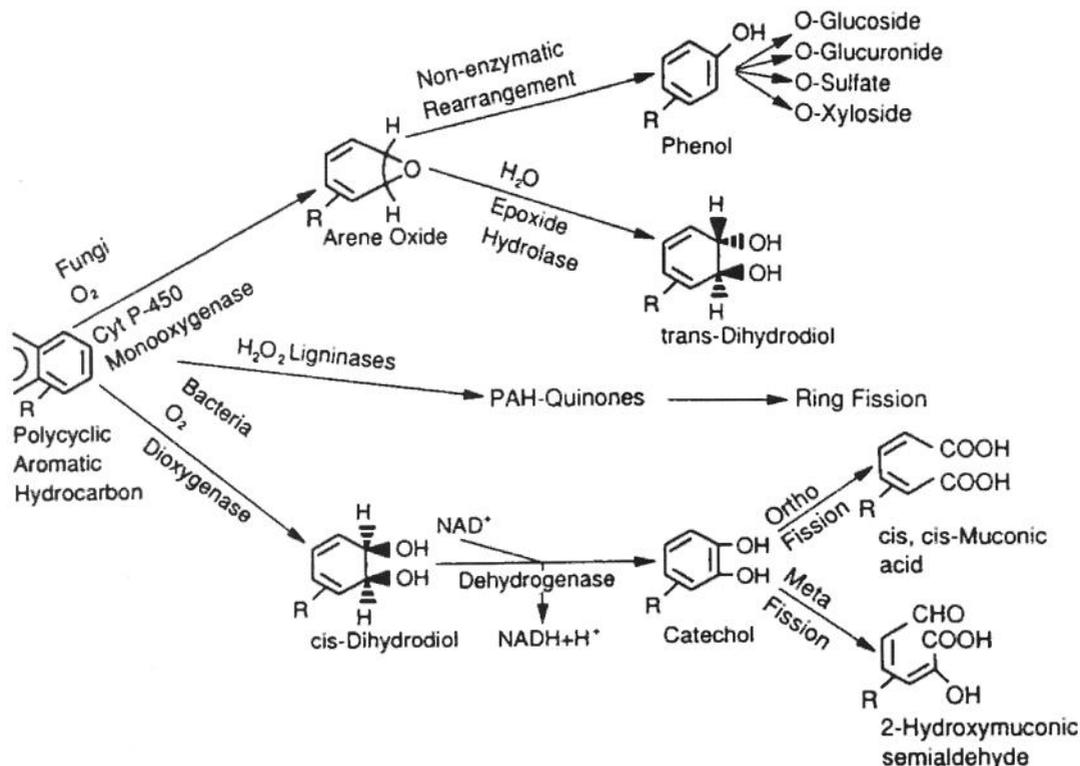


FIGURA 2: Vias metabólicas para o catabolismo microbiano (CERNIGLIA, 1992)

RAVELET et al. (2001), estudou a degradação de pireno por *Mucor racemosus* var. *sphaerosporus* e *Phialophora alba* no solo, com e sem adição de glicose como nutriente ou fonte de carbono, durante 90 dias. Os resultados mostraram que estes fungos apresentaram diferentes habilidades para degradar este composto. *P. alba* aumentou a degradação do pireno em 9 vezes quando comparado com a microflora nativa, mas a adição de glicose inibiu a degradação de pireno. *M. racemosus* var. *Sphaerosporus* não foi eficiente na biodegradação.

## 2.6. HAPs EM ALIMENTOS

Os HAPs ocorrem como contaminantes em diferentes grupos de alimentos, incluindo vegetais, frutas, carnes, óleos e gorduras, grãos, bebidas, alimentos grelhados, torrados e de origem marinha (HOWARD & FAZIO, 1980; GRASSO, 1984; LARSSON, 1986; BARTLE, 1991; CAMARGO, 2000).

### **Alimentos defumados**

Devido à combustão incompleta dos componentes da madeira, os quais geram grandes quantidades de HAPs, produtos defumados são contaminados com hidrocarbonetos (LARSSON, 1986; BARTLE, 1991).

### **Alimentos grelhados**

LARSSON (1986), avaliou a contaminação de alimentos grelhados por HAPs após analisar carnes assadas sobre grelha. A gordura derrete pelo calor do fogo, pirolisa e retorna na forma de fumaça, carregando os compostos carcinogênicos, que contaminam a carne. Quanto maior o teor de gordura maior é a contaminação por HAPs (GREENBERG *et al.*, 1993; NOLL & TOLEDO, 1997).

### **Vegetais e frutas**

Os níveis de HAPs presentes nos vegetais e nas frutas dependem, principalmente, da localização das áreas de cultivo. As partículas de poluição do ar se depositam na superfície dos vegetais e das frutas, concentrando-se na camada de cêra, através da adsorção superficial (COATES *et al.*, 1986; LARSSON, 1986). Dessa forma, os teores de HAPs encontrados nas superfícies dos vegetais ou na casca das frutas serão maiores do que nos tecidos internos. As plantas com maior área superficial de exposição são as mais susceptíveis à contaminação, como no alface e na couve (LARSSON, 1986).

### **Cereais**

Além da contaminação ambiental e do solo, a secagem, processo no qual gases de combustão são aplicados, também é responsável pela contaminação dos grãos com HAPs (LARSSON *et al.*, 1991).

### **Óleos e gorduras**

De acordo com LARSSON (1986), as principais fontes de contaminação do óleo são:

- absorção pelas plantas oleaginosas a partir dos solos contaminados;
- contaminação de planta oleaginosas pela poluição atmosférica;
- secagem direta das sementes com gases de combustão; e,

- absorção de solventes a base de petróleo usados na extração do óleo

Os teores de HAPs em alimentos gordurosos variam muito, dependendo, da origem dos óleos e das sementes e da forma de extração. CAMARGO & TOLEDO 2000, analisando margarinas, cremes vegetais e maioneses encontraram 8 HAPs (fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenzo[ah]antraceno), em concentrações médias na faixa de 1,0 – 21,7  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Os níveis de benzo[a]pireno em margarinas variaram entre 1,7 e 3,9  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .

## **2.7. BIOSURFACTANTES**

Surfactantes são compostos que se acumulam na fase gás/líquido, líquido/líquido e líquido/sólido. Assim, todos surfactantes possuem dois componentes distintos na estrutura molecular. Uma parte pouco solúvel em água (hidrocarboneto) chamada de hidrofóbica ou grupo lipofílico, sendo constituída de cadeias alquil com 8 – 10 carbonos ou um grupo alquilaril. A outra parte da molécula, a qual é solúvel em água, é chamada de grupo hidrofílico. Os surfactantes são classificados de acordo com a natureza da carga de sua parte polar. Os surfactantes aniônicos são carregados negativamente devido a um grupo sulfônico. Os não iônicos possuem constituintes não iônicos e a maioria são produtos de polimerização de 1,2-epoxietano. Os surfactantes catiônicos são caracterizados por um grupo amônio quartenário que é carregado positivamente. Finalmente, os surfactantes anfotéricos têm ambas as cargas, positiva e negativa, em sua parte hidrofílica (VAN GINKEL, 1996).

Os biosurfactantes produzidos por microrganismos apresentam uma grande diversidade de estruturas químicas e moleculares (DESAI & BANAT, 1997). Vários destes compostos possuem aplicação ambiental incluindo a aceleração da biodegradação de hidrocarbonetos hidrofóbicos no solo ou em água (BAI et al., 1997; HARVEY et al., 1990; MÜLLER-HURTING et al., 1993; VAN DYKE et al., 1993; BANAT, 2000).

Um número limitado de microrganismos são capazes de degradar HAPs com quatro ou mais anéis aromáticos (HARAYAMA, 1997). Sua biodegradação é limitada devido a sua baixa solubilidade e disponibilidade ao microrganismo, o qual é consequência de sua hidrofobicidade e forte capacidade em se absorver ao solo (VOLKERING et al., 1995).

GANESHLINGAM et al. (1994), sugeriram que a aplicação de surfactantes como agentes imobilizados pode ser um caminho para aumentar a solubilidade dos HAPs. Os surfactantes auxiliam na degradação por solubilizar ou emulsificar, liberando os hidrocarbonetos adsorvidos na matéria orgânica do solo e aumentando a concentração de compostos hidrofóbicos na fase aquosa, resultando em uma maior taxa de transferência de massa (ARONSTEIN et al., 1991). ROUSE et al. (1994), relataram efeitos contraditórios na eficiência do uso de surfactantes sintéticos e biológicos na biodegradação de HAPs.

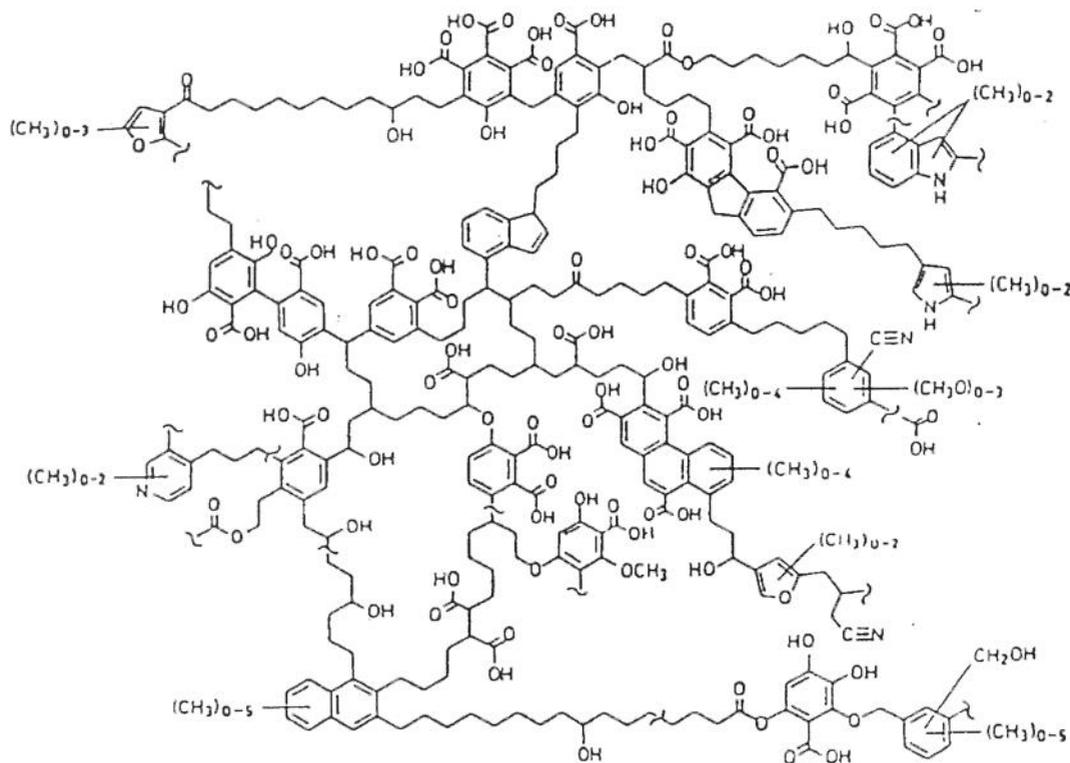
Outras pesquisas indicaram uso potencial destes compostos para aumentar a degradação de HAPs, por melhorar a acessibilidade dos substratos insolúveis aos microrganismos (TIEHN, 1994). A eficiência de biosurfactantes na remediação de solos contaminados por metais, fenantreno, e bifenil (PCBs), tem sido reportado (MILLER, 1995).

## **2.8. ÁCIDO HÚMICO**

O termo substâncias húmicas refere-se a uma mistura de polieletrólitos orgânicos naturais encontrados no solo, sedimentos e água. Esses materiais são produtos da alteração biótica e abiótica de tecidos de plantas e animais em decomposição. Os materiais húmicos são divididos em três frações definidas por sua solubilidade em soluções aquosas variando os valores de pH. O húmus é insolúvel em solução aquosa em qualquer valor de pH; o ácido húmico é solúvel em soluções alcalinas e aquosas; e o ácido fúlvico é solúvel em solução aquosa em qualquer valor de pH (NOVOTNY et al., 1999).

O ácido fúlvico apresenta a maior quantidade de anéis aromáticos, menor peso molecular, e é o mais polar das três frações (AIKEN et al., 1985; HAYES et al., 1989).

Os ácidos húmicos são compostos por macromoléculas complexas e policondensadas (Fig. 3), tornando-os matéria orgânica muito recalcitrante no solo, sendo originários da lignina, depois de consideráveis mudanças em sua estrutura e desordenada condensação com muitos sub-produtos de outros precursores alterados como taninos, proteínas e carboidratos. Apresentam uma estrutura mais complexa e condensada que a lignina, o que explica sua estabilidade para a degradação microbiana no solo (STEVESON, 1982; DEHORTER & BLONDEU, 1992). Os ácidos húmicos são formados de anéis aromáticos ligados por estruturas alquila dando flexibilidade à cadeia. As estruturas alifáticas apresentam-se em maior quantidade que as estruturas aromáticas.



**FIGURA 3:** Estrutura química de ácidos húmicos (SCHULTEN & PLAGE, 1992).

A via bioquímica para a formação de húmus a partir da matéria orgânica é muito complexa e envolve um número de reações degradativas e de condensações. Diversos esquemas para a formação de húmus têm sido propostos. De acordo com VARADACHARI & GHOSH (1984), a lignina é primeiro degradada por enzimas extracelulares para unidades menores, que são absorvidas pela célula microbiana, onde são parcialmente convertidas a fenóis e quinonas. Estas substâncias são liberadas juntamente com enzimas oxidativas para o meio ambiente, onde são polimerizadas por um mecanismo de radical livre. Fungos como *Phanerochaete chrysosporium* são capazes de degradar este composto, causando modificações em sua estrutura (BLONDEU, 1989; KONTCHOU et al., 1993).

BLONDEU (1989), observou que a biodegradação de ácidos húmicos ocorreu durante o metabolismo secundário e em culturas com limitações de nitrogênio. Os resultados experimentais sugerem que todo, ou parte do sistema da linhagem de *P. chrysosporium* BKM-F 1767 que

degrada lignina, estaria envolvido com a degradação de ácidos húmicos. DEHORTER & BLONDEU (1992), demonstraram o importante papel da atividade de manganês-peroxidase na degradação de compostos húmicos.

Os ácidos húmicos foram descritos em experimentos por aumentar significativamente a dissolução de HAPs (XU et al., 1994; LESAGE et al., 1995). Fungos presentes no solo foram descritos devido sua capacidade em hidrolisar HAPs na presença de ácidos húmicos (HOFMANN et al., 1994). Segundo LESAGE et al. (1997), a adição de ácido húmico ao meio de cultura das linhagens de *Mucor cicinelloides* e *Trichoderma hazarnium* levou a um significativo aumento na quantidade de HAP na fase aquosa.

A adição de substâncias húmicas em aquíferos contaminados aumentou a solubilidade dos HAPs, sendo que a concentração de 800 mg L<sup>-1</sup> de ácidos húmicos resultou em um aumento de solubilidade (LESAGE et al., 1995).

SHINOZUKA & LEE (1991), relataram que os ácidos húmicos formam agregados tipo micela. A solubilidade de pireno aumentou linearmente com o aumento da concentração de ácidos húmicos (TANAKA et al., 1997).

## **2.9. ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS**

Sendo a lignina um polímero complexo, sua biodegradação requer interações entre enzimas, para que ocorra uma completa mineralização até CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (BONO et al., 1990). As diferenças estruturais e químicas no substrato não homogêneo de lignina conduzem a uma especialização na produção das enzimas ligninolíticas dos microrganismos capazes de degradá-las, que são classificados assim em cinco grupos (TUOR et al., 1995):

1. Fungos de decomposição branca que expressam LiP, MnP e lacase. Este grupo contém os mais conhecidos fungos de decomposição branca *Coriolus versicolor*, *P. chrysosporium* e *Phlebia radiata*. O *P. chrysosporium* está neste grupo desde que a produção de lacase foi reportada (ANDER et al., 1980; ERIKSSON et al., 1983). Entretanto este fungo não é considerado produtor de lacase. Todos eles colonizam madeiras decíduas, e somente *P. radiata* degrada coníferas.

2. Fungos de decomposição branca que produzem MnP e lacase, não secretam níveis detectáveis de LiP. São potentes degradadores de lignina. *Dichomitus squalens* e o fungo comestível *Lentinula edodes* pertencem a este grupo.
3. Fungos de decomposição branca que apresentam produção de LiP e outra fenol-oxidase. Lacase é a fenol-oxidase mais produzida, mas no caso do *Coriolus pruinosum* foi detectada a produção de MnP. Estes fungos crescem em madeiras duras. Excetuando-se *Phlebia tremellosus* que também degrada coníferas.
4. Quatro fungos de decomposição branca (*Bjerkandera adusta*, *Daedaleopsis confragosa*, *Phallus impudicus* e *Polyporus varius*), secretam somente LiP. Eles são degradadores de madeiras duras.
5. O último grupo consiste de fungos que não estão completamente caracterizados. *Fomes lignosus* e *Trametes cingulata* são de degradação branca, mas não foram detectadas quaisquer das enzimas em seus meios de cultura.

Aparentemente os fungos de decomposição branca degradam a lignina por diversas combinações de peroxidases e oxidases. A degradação da lignina por fungos que secretam principalmente LiP envolvem provavelmente diferentes vias e diferentes mediadores, oposto aos fungos que secretam MnP e lacase. Os fungos podem também expressar diferentes produções de enzimas em culturas agitadas e estacionárias (TUOR et al., 1995).

O grupo das enzimas fenol-oxidases inclui principalmente três tipos de enzimas: peroxidase, lacase e tirosinase. As peroxidases e lacases estão diretamente envolvidas na degradação da lignina e compostos com estruturas semelhantes, sendo produzidas extracelularmente, enquanto a tirosinase é produzida intracelularmente, não possuindo importante papel na degradação destes compostos (SZKLARZ et al., 1989).

As enzimas extracelulares envolvidas na degradação do polímero de lignina são lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP), como também lacase e enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), (FIELD et al., 1993).

A vantagem do tratamento enzimático quando comparado aos tratamentos convencionais inclui: aplicação para materiais recalcitrantes, operação com altas e baixas concentrações de contaminantes em um amplo valor de pH, temperatura e salinidade e fácil controle do processo (CAMERON et al., 2000).

### **2.9.1. PEROXIDASES**

As peroxidases são hemoproteínas, produzidas principalmente por microrganismos e plantas, as quais catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio.

#### **Lignina-peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)**

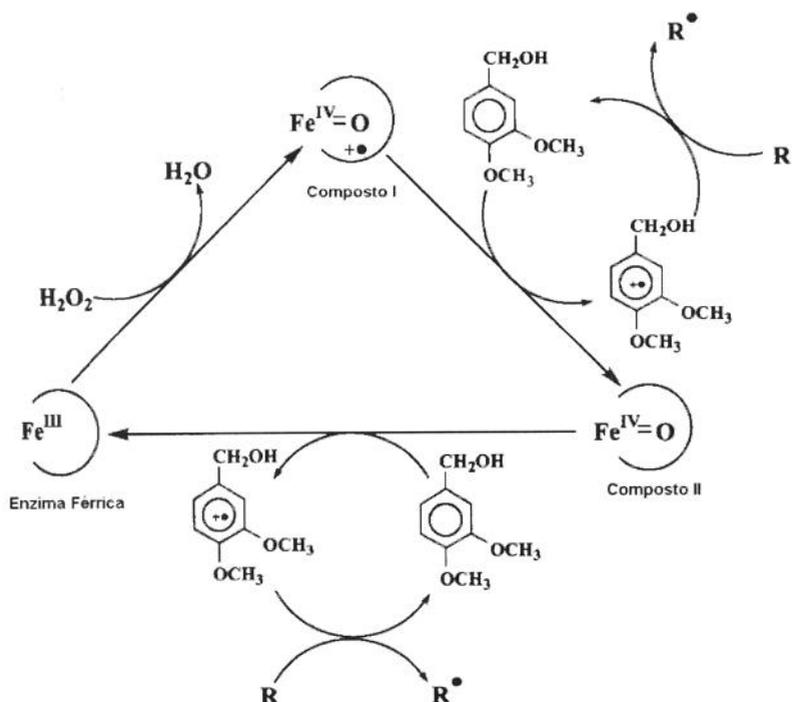
Esta enzima foi isolada por TIEN & KIRK e por GLENN et al. em 1983, trabalhando independentemente. É uma glicoproteína, contendo 20-30% de açúcar, ferro como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (HATAKA,1994; REDDY & D'SOUZA, 1994). A LiP é produzida por quase todos os fungos de decomposição branca. Juntamente com outras enzimas, a LiP é considerada a maior constituinte do sistema que degrada lignina em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN et al., 1983; TIEN & KIRK, 1983). Sua massa molar é de aproximadamente 38-43 KDa, apresentando ponto isoelétrico entre 3,2 - 4,0 e pH ótimo de atividade próximo a 3,0.

Diversas isoenzimas já foram isoladas do fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*, sendo que sua produção é regulada geneticamente em condições limitantes de nitrogênio e carbono. A LiP é produzida durante o metabolismo secundário, em resposta a falta desses nutrientes. Na presença desses nutrientes ocorre completa repressão de sua síntese (REDDY, 1993; REDDY & D'SOUZA,1994).

A LiP catalisa uma grande variedade de compostos modelos de lignina e poluentes aromáticos, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BUSWELL & ODIER, 1987; HIGUCHI, 1990; VALLI & GOLD, 1991; KARAM & NICELL, 1997). Essas reações incluem oxidação do álcool benzílico, quebra das cadeias laterais, reações de abertura de anéis aromáticos, demetilações e declorinações oxidativas. Todas essas reações são compatíveis com o mecanismo envolvido na degradação não específico desta enzima (RENGANATHAN & GOLD, 1986; KIRK & FARREL, 1987).

O mecanismo de atuação da LiP (Fig. 4) se dá através de oxidação pela abstração de um

elétron da molécula de lignina e compostos semelhantes, resultando na formação de radicais catiônicos arila. Posteriormente, através de uma série de reações não enzimáticas os radicais dão origem a uma variedade de produtos finais (HIGUCHI, 1990; REDDY & D'SOUZA, 1994).



**FIGURA 4:** Ciclo catalítico da lignina peroxidase (CAMERON et al., 2000).

O álcool veratrílico, um metabólito produzido por diversos fungos de decomposição branca sob condições ligninolíticas, desempenha um papel importante no ciclo catalítico desta enzima. Ele atua como um agente redutor da enzima e aparentemente a protege da inativação por excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TIEN & KIRK, 1983; WARIISHI & GOLD, 1990; FIELD et al., 1993).

Existe um interesse crescente no estudo desta enzima e também dos fungos que a produzem, devido ao seu potencial de aplicação industrial em processos de descontaminação de ambientes (ERIKSSON, 1990). As enzimas oxidativas possuem um importante papel na descontaminação de efluentes e solo (CAMERON et al., 2000).

### Manganês-peroxidase (MnP; EC 1.11.1.7)

Esta enzima foi isolada de culturas de *P. chrysosporium* por KUWAHARA et al. em 1984. É uma glicoproteína com ferro como grupo prostético, depende de  $H_2O_2$  para sua atividade, seu ponto isoelétrico é de aproximadamente 4,2-4,9 e massa molar entre 45-47 KDa, sendo o ciclo catalítico semelhante ao da LiP (GLENN & GOLD, 1985; PASZCZYNSKI et al., 1985). A MnP é produzida simultaneamente com a LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono no meio de cultura (BUSWELL & ODIER, 1987).

As MnPs participam de reações de despolimerização de ligninas e cloroligninas, demetilação de lignina e deslignificação (LACKNER et al., 1991; WARIISHI et al., 1991; PEREZ & JEFFRIES, 1992; PAICE et al., 1993;).

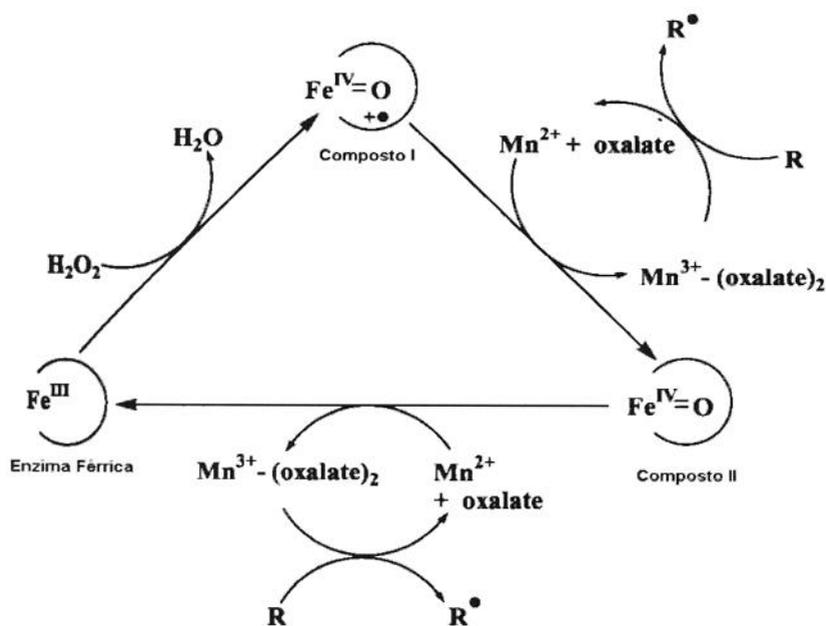


FIGURA 5: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (CAMERON et al., 2000).

A oxidação de lignina e outros compostos fenólicos por MnP é dependente de íons de manganês (GLENN & GOLD, 1985; PASZCZYNSKI et al., 1985; GOLD et al., 1989; HOFRICHTER et al., 1999). Como é mostrado na Figura 5, a redução primária do substrato no ciclo catalítico de MnP é Mn(II), que reduz eficientemente os compostos I e II, gerando Mn(III), que oxida o substrato orgânico. Ácidos orgânicos como oxalato e malonato, que são secretados

por *P. chrysosporium* (WARIISHI et al., 1992), estimulam a reação de MnP por estabilizar Mn(III), e assim podendo se difundir para catalisar a oxidação via um elétron de compostos fenólicos, gerando radicais fenoxila (GLENN & GOLD, 1985; GLENN et al., 1986; GOLD et al., 1989; WARIISHI et al., 1989; WARIISHI et al., 1992).

## 2.9.2. POLIFENOL OXIDASES (FENOLOXIDASES)

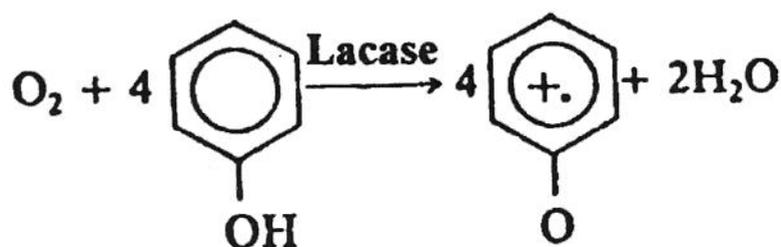
As fenoloxidasas são oxiredutases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. Elas são sub-divididas em duas classes, tirosinases e lacases, e ambas reagem com oxigênio e não necessitam de co-fatores (JOVILET, et al., 1998; CHEVALIER et al., 1999).

### Tirosinase (polifenol oxidase ; catecolase, EC 1.10.3.1)

As tirosinases são produzidas intracelularmente (SZKLARZ et al., 1989). Elas catalisam a hidroxilação de monofenóis com oxigênio molecular para formar *o*-bifenóis e então por desidrogenação são transformados em *o*-quinonas que posteriormente sofre uma polimerização não enzimática (LIND et al., 1999; KARAM & NICELL, 1997).

### Lacases (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

A lacase é uma polifenoloxidase, descoberta em exudados de *Rhus vernicifera*, árvore japonesa, (YOSHIDA, 1883) e subseqüentemente foi demonstrada também como uma enzima fúngica (BERTRAND, 1896; LABORDE, 1896). É uma glicoproteína, que contém cobre em seu sítio ativo, não requer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e catalisa a redução de O<sub>2</sub> para H<sub>2</sub>O (Fig. 6). Esta enzima é produzida por todos os fungos de decomposição branca (SZKLARZ et al., 1989), com exceção de *P. chrysosporium* (KIRK & FARRELL, 1987). Entretanto, sob condição especial, o *P. chrysosporium* foi capaz de produzi-la (SRINIVASAN et al., 1995). As formas constitutiva e induzida são conhecidas, sendo que a forma induzida geralmente apresenta maior atividade (LEONOWICZ et al., 1985).



**FIGURA 6:** Representação de uma reação catalisada por lacase.

Em geral, a lacase apresenta 4 átomos de cobre, os quais são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos: cobre tipo 1, 2 e 3, que são diferenciados por propriedades específicas, tendo um importante papel no mecanismo catalítico da enzima (McGUIRL & DOOLEY, 1999). De acordo com CALL & MÜCKE (1997), o cobre 1 e 2 estão envolvidos na captura e transferência do elétron. O cobre tipo 2 e 3 estão envolvidos na ligação com o oxigênio. Compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza, e sua oxidação é importante em processos como, oxidação celular, proteção da parede celular, corpo de frutificação, processamento de sucos e vinhos, delignificação de polpa, descontaminação de solos e água poluídos (XU, 1996; SMITH et al., 1997).

A lacase catalisa a oxidação via transferência de um elétron de radicais fenóis para radicais fenoxila. A especificidade da enzima ao substrato oxidado depende da origem da lacase. Assim lacases de diferentes fungos podem oxidar diferentes substratos, inclusive em diferentes pHs. Algumas lacases apresentam pH ótimo em faixas ácidas (2,5-3,5), enquanto outras apresentam atividade ótima em pH neutro (6-7), (RINGLING & VAN ALFEN, 1993). A função fisiológica desta enzima não é clara, e seu papel na biodegradação da lignina é incerto, uma vez que ela pode causar polimerização de lignina (GOLD & ALIC, 1993; THURSTON, 1994). Assim propôs-se que a lacase tem um papel na redução da toxicidade dos compostos fenólicos por reações de polimerização (BOLLAG et al., 1988).

A lacase oxida diversos substratos, corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, HAPs, organofosforados e dímeros modelo de lignina (CHIVUKULA & RENGANATHAN, 1995).

### 2.9.3 ENZIMAS PRODUTORAS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

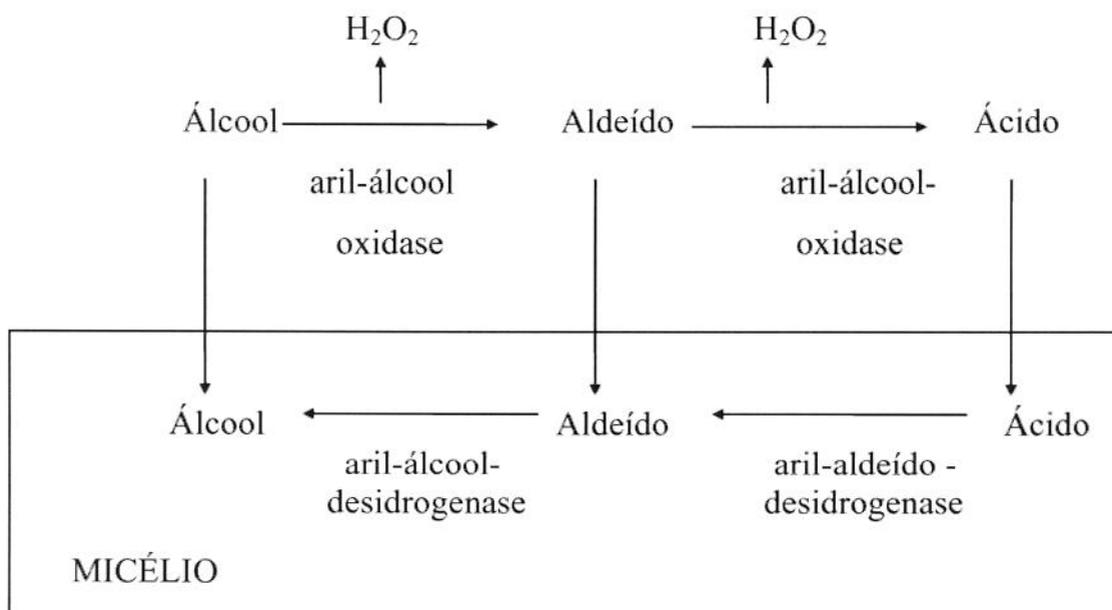
A secreção de  $H_2O_2$  coincide com o princípio da atividade ligninolítica. Os fungos de decomposição branca produzem uma variedade de oxidases que são capazes de gerar  $H_2O_2$ , presumivelmente para a utilização por peroxidases extracelulares durante a degradação do polímero de lignina.

Uma das enzimas que geram  $H_2O_2$  é intracelular e idiofásica, aril álcool oxigenase (AAO). Esta enzima oxida alcoóis aromáticos para aldeídos, e reduz  $O_2$  para  $H_2O_2$ . Estudos com *Pleurotus eryngii* demonstraram o seguinte ciclo, conforme mostrado na Figura 7 (EVANS et al., 1994).

AAO não é o único sistema de fungos de decomposição branca disponível para produzir  $H_2O_2$  extracelular. Muitas outras oxidases extracelulares e intracelulares são conhecidas por fornecer  $H_2O_2$ . A enzima extracelular glioxal-oxidase é produtora de  $H_2O_2$  (GOLD & ALIC, 1993). A MnP também pode gerar  $H_2O_2$  quando catalisa a oxidação de NAD(P)H (ASADA et al., 1986).

Diversas enzimas intracelulares que produzem  $H_2O_2$  têm sido reportadas incluindo glicose-1-oxidase, piranose-oxidase, metanol-oxidase e acil-COA-oxidase (GREENE & GOULD, 1984; KELLEY & REDDY, 1988; VOLC & ERIKSSON, 1988; ERIKSSON & NISHIDA, 1988; VOLC et al., 1991).

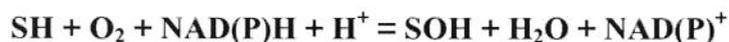
A enzima álcool veratrílico-oxidase também parece estar envolvida na produção de  $H_2O_2$ , além de desempenhar um papel na prevenção da polimerização dos compostos fenólicos, reduzindo assim a massa molar dos lignosulfonados solúveis gerados durante a degradação da lignina (GUILLÉN et al., 1992; MARZULLO et al., 1995).



**FIGURA 7:** Esquema representativo da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular, através da atuação das enzimas Aril-Álcool-Oxidase, Aril-Álcool-Desidrogenase e Aril-Áldeído-Desidrogenase (EVANS et al., 1994).

## 2.10. CITOCROMO P-450 (E.C. 1.14.14.1)

O sistema citocromo P-450 são enzimas multicomponentes que possuem uma heme proteína hidrolase e um ou dois componentes transportadores de elétrons. Este sistema catalisa a hidroxilação de uma variedade de substratos, como mostrado na reação abaixo (HARAYAMA & KOK, 1992):



Os elétrons necessários para a inserção do oxigênio no substrato molecular (S) são doados por um sistema doadores de elétrons. Este sistema pode ser composto por duas proteínas (adrenodoxina e adrenodoxina redutase) para citocromo P-450 mitocondrial e procariotos ou uma única proteína (citocromo P-450 redutase, CPR), para as enzimas localizadas no retículo endoplasmático. Muitos citocromos P-450 de fungos estão localizados no retículo endoplasmático (VAN DEN BRINK et al., 1998).

O nome citocromo P-450 é originário da característica do máximo de absorção, 450 nm, da enzima ligada ao monóxido de carbono(CO). Quando a estrutura da proteína é alterada, por detergentes ou outros reagentes, o ânion tiolato é “trocado” por um grupo imidazole do resíduo de histidina sendo absorvido a 420 nm quando reduzido por CO (OMURA, 1999). A massa molar de todos os citocromos P-450 está ao redor de 45-60 KDa. Muitos citocromos P-450 têm sido identificados em procariotos, leveduras, fungos, plantas, insetos e em mamíferos (NEBERT et al., 1991). Este sistema de enzima está envolvido na transformação específica de compostos endógenos, como biossíntese da vitamina D e de hormônios (GUENGERICH, 1991; OHKUMA et al., 1991), ou no catabolismo de uma variedade de compostos xenobióticos. As enzimas que realizam transformações específicas tem substratos específicos limitados, e sua síntese é altamente regulada. Já as que realizam as reações catabólicas são geralmente não específicas, e essas reações protegem os mamíferos dos produtos químicos encontrados na natureza (NEBERT & GONZALEZ, 1987; GUENGERICH, 1991; PORTER & COON, 1991).

O passo da conversão mediado por citocromo P-450 faz parte de processos de biotransformações fúngicas específicas. O envolvimento de enzimas do sistema cit P-450 em muitas dessas reações foi sugerida, baseada em experimentos não conclusivos, por exemplo, dependência de NADPH na reação ou a utilização de inibidores deste sistema como proadifem (SKF525A), metirapone, os quais inibem a conversão enzimática. Provas formais, obtidas por purificação e caracterização das enzimas envolvidas, têm sido fornecidas em poucos casos, devido a dificuldade em obter-se quantidades suficientes da enzima ativa. A purificação da enzima citocromo P-450 é dificultada pela instabilidade da proteína e baixos níveis de expressão. O melhor estudo de reações mediada por citocromo P-450 é o da degradação de HAPs como benzo[a]pireno, a biotransformação de esteróides como progesterona e lanosterol, e a assimilação de alcanos de cadeia longa (VAN DEN BRINK et al., 1998).

Embora o padrão metabólico da degradação de HAPs por fungos assemelha-se ao padrão observado com cit P-450 de mamíferos (CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA et al., 1992), pouca evidência no envolvimento deste sistema de enzima foi fornecido. Prova formal do envolvimento do sistema cit P-450 requer a purificação da enzima envolvida, porém a purificação de cit P-450 fúngico é extremamente difícil. Entretanto, o envolvimento de cit P-450 em muitos casos foi

concluído de forma indireta ou pelo uso de inibidores ou pela dependência de NADPH no ciclo (DUTTA et al., 1983; CERNIGLIA et al., 1992).

Os fungos são hábeis para utilizar um sistema de enzima alternativo, juntamente com citocromo P-450, para a descontaminação de HAPs. De acordo com BEZALEL et al., (1996), é provável que tanto o sistema ligninolítico como o sistema cit P-450 estejam envolvidos na degradação de HAPs *in vivo*. Segundo sua hipótese, o sistema cit P-450 realiza a modificação inicial dos grupos aromáticos seguido pela degradação dos HAPs pelo sistema ligninolítico. Um estudo do sistema cit P-450 mediando a hidroxilação de benzo[a]pireno foi identificado nos fungos ligninolíticos de degradação branca, *Pleurotus pulmonarius* e *Phanerochaete chrysosporium* (MASAPHY et al., 1995 e 1996).

O ciclo catalítico do sistema citocromo P-450 (Fig 8), envolve vários passos de oxidação e redução, onde o substrato final é liberado oxidado. Algumas vezes o substrato pode seguir por um desvio, onde ele é hidroxilado por peroxidases sem a necessidade de passar pelo sistema doador de elétrons.

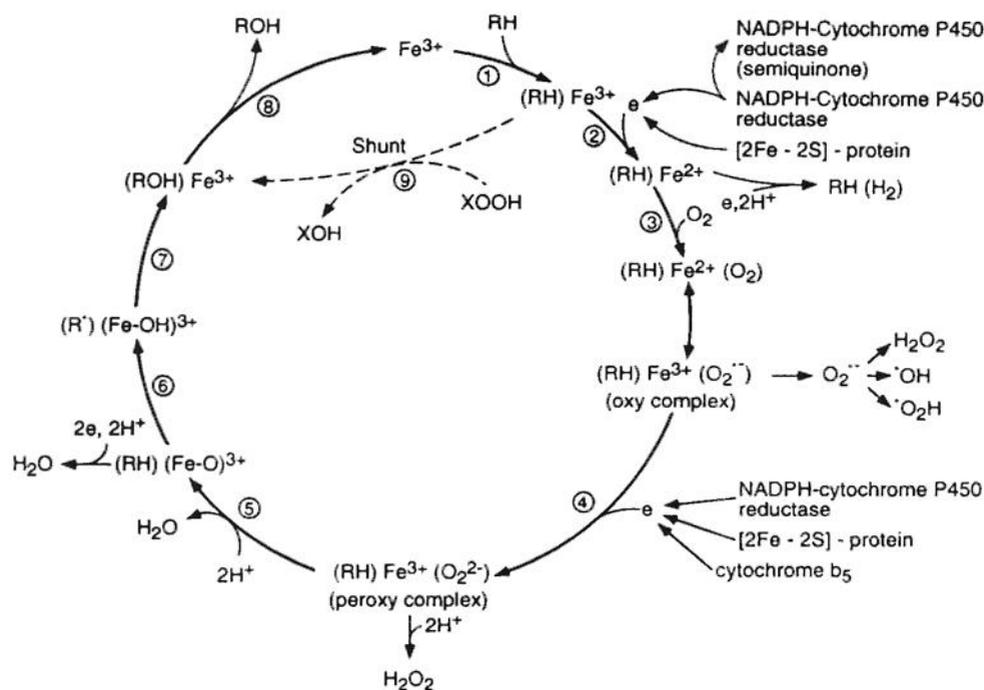


FIGURA 8: Ciclo catalítico do sistema enzimático P-450 (BERNHARDT, 1995)

### **3. OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram:

- Propor uma identificação das cinco linhagens fúngicas ligninolíticas utilizadas neste trabalho;
- Determinar a capacidade dessas linhagens em degradarem HAPs, em meios líquido e sólido;
- Estudar o mecanismo enzimático e a produção de surfactantes durante a degradação de HAPs;
- Estudar o efeito da adição de ácidos húmicos na degradação dos HAPs;
- Estudar a degradação destes HAPs, para aplicação destas linhagens em solos contaminados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS**

Os fungos utilizados neste trabalho foram isolados de amostras coletadas do solo da Reserva Ecológica Juréia-Itatins (São Paulo). Esta região apresenta alta concentração de ácido tânico e húmico, originada da biodegradação de material lignocelulósico. As amostras de solo foram coletadas próximas a rios, pântanos, estuários, encostas e vegetações. Cinco linhagens fúngicas 710 (*Acremonium* sp.), 870 (*Trichoderma* sp.), 898 (*Fusarium* sp.), 984 (*Aspergillus* sp.) e 1040 (*Verticillium* sp.) da ordem Deuteromicetos, fungos imperfeitos que se reproduzem de maneira assexuada, geralmente através de conídios. São capazes de crescerem em ácido húmico e HAPs como fontes de carbono, apresentando diferentes taxas de degradação de ambos os compostos, com sistema ligninolítico diferenciado para cada linhagem (CLEMENTE, 1997; CLEMENTE et al, 2001).

### **4.2. PREPARO DO INÓCULO**

Os fungos foram mantidos em câmara fria à 16°C, em tubos inclinados contendo batata dextrose ágar (BDA – Difco). O crescimento das linhagens foi acompanhado em placas de Petri com BDA mantidas em estufa à 30°C por aproximadamente 8-10 dias, atingindo o máximo crescimento micelial. Após esse período, o micélio foi quadriculado em 1cm x 1cm e utilizado como inóculo pedaços de 1cm<sup>2</sup>, 2 x 1cm<sup>2</sup> ou 3 x 1cm<sup>2</sup>.

### **4.3. PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO**

O crescimento foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL de meio líquido base, conforme descrito na Tabela 1.

**TABELA 1.** Composição do meio líquido base em 1000 mL de água destilada

| Componente                                       | Concentração (g) |
|--|------------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,5              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                  | 0,8              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | 0,3              |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O             | 0,3              |
| ZnSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O             | 0,004            |
| MnSO <sub>4</sub>                                | 0,005            |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O             | 0,055            |
| Extrato de levedura                              | 0,2              |

Após esterilização a 120°C por 15 minutos, adicionou-se para cada litro de meio base 1,0 mL de tiamina. A vitamina tiamina foi preparada separadamente, com uma concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>, esterilizada por filtração em membrana Millipore (0,22 µm) e estocada em geladeira. Após a adição da tiamina o meio foi distribuído em frascos de Erlenmeyers e inoculados.

#### **4.4. ADIÇÃO DAS FONTES DE CARBONO**

As fontes de carbono (HAPs) foram preparadas separadamente em condições estéreis. Preparou-se uma solução estoque (v/v) de naftaleno (5%), antraceno (0,75%), pireno (1%) e benzo[a]pireno (0,5%) dissolvidos em acetona. Para cada 30 mL de meio adicionou-se asepticamente os HAPs com concentração final de 0,5%, 0,1%, 0,05% e 0,05% (v/v), respectivamente.

#### **4.5. ESTUDO DO EFEITO DO INÓCULO NA BIODEGRADAÇÃO DE HAPs**

Os frascos foram inoculados com 1cm<sup>2</sup>, 2 x 1cm<sup>2</sup> ou 3 x 1cm<sup>2</sup> e incubados em condição estacionária a 30°C por um período de 5 e 10 dias de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicatas e frascos controles, sem inóculo, foram utilizados como controle abiótico. O pH do meio foi acertado com ácido clorídrico (0,1 mol L<sup>-1</sup>) para 5,0.

## **4.6. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS**

### **4.6.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Esta técnica teve como objetivo a visualização das estruturas dos microrganismos, devido ao alto poder de resolução deste microscópio, além de fornecer uma visão tridimensional da superfície celular.

O protocolo utilizado foi uma adaptação feita a partir de dados de literatura para processamento de amostras biológicas (BAL-TEC, 1999). O crescimento das linhagens foi realizado em Erlenmeyers contendo meio líquido batata-glicose (Difco), e incubadas a 30°C durante 5 dias. Após este período as linhagens foram centrifugadas (30 minutos, 57.770 g, 5°C) e tratadas para a MEV, conforme descrito a seguir.

#### **4.6.1.1. Fixação das células**

A massa fúngica foi tratada com uma solução fixadora contendo 18 mL de tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,35), 16 mL de água destilada, 2 mL de glutaraldeído (50%) e 0,8 mL de ácido tânico (2%), por um período de 24 horas. Em seguida, foram lavadas em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,35), por 10 minutos. Para manter as células túrgidas das suspensões, as amostras foram tratadas em 2,5 mL de solução de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,35) por 1 hora. O excesso de OsO<sub>4</sub> foi retirado por lavagem das amostras em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,35) por 10 minutos.

#### **4.6.1.2. Desidratação das amostras e incorporação de CO<sub>2</sub>**

As células túrgidas foram desidratadas em banhos sucessivos de 10 minutos, em soluções de etanol de concentrações crescentes entre 30 e 100%, e submetidas a um tratamento crítico de pressão e temperatura (ponto crítico), no qual todo álcool das amostras, foi substituído gradualmente por CO<sub>2</sub>.

#### **4.6.1.3. Aumento da condutividade elétrica das amostras por impregnação de átomos metálicos de ouro**

As amostras foram tratadas com banho de ouro em Sputter Cater mod. SCD 050, para aumentar a sua condutibilidade elétrica, e foram mantidas em dessecador até sua visualização em MEV.

#### **4.6.1.4. Análise morfológica das espécies**

Após as etapas de preparo descritas anteriormente, as amostras foram adaptados em um porta-amostras e levads ao Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM – 5800LV. Utilizou-se 10 KV de aceleração de corrente e uma distância de 15 mm entre as amostras e o filamento de tungstênio, em todas as análises. Os procedimentos fotográficos foram realizados com filme de 120 mm T-max asa 100 (Kodak).

#### **4.6.2. TÉCNICA DO MICROCULTIVO (RIDDEL, 1950)**

Em placas contendo meio BDA, as linhagens foram inoculadas por picada e cobertas com uma lamínula estéril. Foi incubada à 30°C por um período de 5 dias. Após este período, a lamínula contendo o crescimento foi colocada sobre uma lâmina contendo uma gota do corante “lactofenol cotton blue”. Foi examinado em microscópio para visualização das estruturas fúngicas.

#### **4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE HAP CAPAZ DE INIBIR O CRESCIMENTO**

As linhagens foram cultivadas em meio líquido base, onde foram adicionadas diferentes concentrações dos HAPs, verificando assim a máxima concentração capaz de inibir o crescimento das linhagens. Foram preparados os controles, estes sem a adição dos HAPs mas na presença de acetona e/ou na ausência deste composto. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

#### **4.7.1. ADIÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS HAPS**

Os hidrocarbonetos foram adicionados ao meio líquido junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo. As linhagens foram incubadas em condição estacionária a 30°C por um período total de 30 dias. Foram crescidas linhagens controles, isto é, sem adição dos HAPs. Segue abaixo os valores das diferentes concentrações finais de HAPs utilizadas:

- ❖ Naftaleno: 0,3% (v/v), 0,5%(v/v), 0,7 (v/v) e 0,9% (v/v);
- ❖ Antraceno: 0,1% (v/v), 0,2% (v/v), 0,4% (v/v) e 0,5% (v/v);
- ❖ Pireno: 0,05% (v/v), 0,08% (v/v), 0,1% (v/v) e 0,2% (v/v); e,
- ❖ Benzo[a]pireno: 0,05% (v/v), 0,08% (v/v), 0,1% (v/v) e 0,2% (v/v).

#### **4.7.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA**

Após o período de crescimento as linhagens foram filtradas em papel de filtro (Whatman nº1), previamente pesado onde o micélio ficou retido. Este foi levado à estufa de 100°C até obtenção do peso constante. Os valores foram expressos em mg de massa seca, sendo o resultados descontados dos controles.

#### **4.8. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE HAPS UTILIZANDO-SE OS INÓCULOS SELECIONADOS**

O crescimento foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio líquido base (Tabela 1), sendo que os HAPs foram adicionados juntamente com o inóculo (totalizando um período de crescimento de 30 dias) ou no 3º dia de cultivo (totalizando um período de crescimento de 33 dias). As amostras foram retiradas em intervalos de 3 dias até o 15º dia, onde após este período retirou-se amostras a cada 5 dias, totalizando um período de 30 dias de cultivo. Foram analisadas as atividades ligninolíticas, a presença de citocromo P-450, produção de proteína micelial, produção de biosurfactantes e a degradação por CLAE.

#### **4.9. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO NA BIODEGRADAÇÃO DOS HAPs**

O ácido húmico (0,01%) foi adicionado junto com o meio líquido e esterilizado ou preparado uma solução estoque (1,0%) e após 3 dias de crescimento adicionado este composto ao meio de cultivo, obtendo-se uma concentração final de 0,01%.

##### **4.9.1. ESTUDO DA DESCOLORAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO**

Através da espectroscopia de absorção no UV-Vis, verificou-se a descoloração dos sobrenadantes (diluídos 1:10) quando crescidos em ácido húmico como fonte de carbono, variando-se o comprimento de onda entre 250-500 nm.

#### **4.10. OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE**

Após o crescimento, as amostras foram centrifugadas a 57.770 g por 30 minutos a 5°C. Nos sobrenadantes obtidos foram determinadas a produção de surfactantes e as atividades ligninolíticas, produção de citocromo P-450 e proteína micelial, descoloração do meio de cultivo e a degradação.

#### **4.11. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA MICELIAL**

A concentração de proteína foi determinada da seguinte maneira (MESSNER & KUBICEK, 1991): o micélio foi lavado com água e centrifugado a 57.770 g por 15 minutos, após esta lavagem foi adicionado 3,0 mL de NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) homogeneizado em sonicador (4°C, 10 minutos). A suspensão foi então centrifugada em Eppendorf, e a proteína foi determinada adicionando-se 800 µL do sobrenadante e 200 µL do reagente do kit Bio-Rad, misturado, e após um período de 5 minutos a 1 hora foi feita a leitura da absorbância à 595 nm.

O método de determinação de proteína intracelular utilizando o kit Bio-Rad é baseado em BRADFORD (1976), sendo um método colorimétrico simples e seguro para determinação da concentração total de proteína.

O kit Bio-Rad é baseado na mudança de cor do corante ácido “Coomassie Brilliant Blue” em resposta a várias concentrações de proteína, e subsequente leitura a 595 nm em

espectrofotômetro. Comparando o resultado obtido das amostras com uma curva padrão obtêm-se a concentração de proteína existente. E relacionando a concentração de proteína (mg) com o volume inicial de amostra (mL) obteve-se a biomassa fúngica, onde o valor foi expresso em mg proteína por 30 mL de amostra. Os resultados das amostras foram descontados do controle. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

#### **4.12. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SURFACTANTES**

A atividade de biosurfactante foi determinada através da agitação vigorosa em agitador de tubos (Vortex) contendo 3,5 mL dos sobrenadantes das culturas, previamente centrifugadas e 2,0 mL de tolueno (WILLUMSEN & KARLSON, 1997 - modificado) como substrato. Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi determinada a 610 nm e relatada como atividade de emulsificação (JOHNSON et al., 1992). Após 24 horas, a emulsão água em óleo foi expressa em centímetro devido à altura da camada emulsificada (halo) formada nos tubos (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

#### **4.13. DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS**

O cálculo para a quantificação da atividade enzimática de ligninases foi realizado de acordo com a equação apresentada abaixo

|  |   |
|--|---|
|  | Onde:                                       |
|  | A = Absorbância ( $\Delta$ Abs);            |
| $\frac{A}{\epsilon \times 10^6 \times R \times t} = U/L$ | $\epsilon$ = Coeficiente de absorção molar; |
|  | R = Quantidade de caldo enzimático (mL); e, |
|  | t = tempo de reação (minuto).               |

### **Lignina Peroxidase**

Esta atividade foi determinada (TIEN & KIRK, 1984) pela oxidação do álcool veratrílico ( $\epsilon_{310}=9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A mistura da reação foi composta de 0,6 mL do sobrenadante; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; 0,2 mL de álcool veratrílico  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão tartarato de sódio  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,0).

A reação foi iniciada pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância à 310 nm.

### **Manganês Peroxidase**

Esta atividade foi quantificada (KUWAHARA et al., 1984) através da oxidação do vermelho de fenol ( $\epsilon_{310}=4.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), na presença de manganês e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A mistura da reação foi composta de 0,5 mL do sobrenadante; 0,1 mL de lactato de sódio  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ; 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,05 de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão succinato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 4,5).

A mistura foi incubada a  $30^\circ\text{C}$  por 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. A absorbância foi lida em 610 nm.

### **Lacase**

Para se determinar esta atividade (SZKLARZ et al., 1989 – modificada) utilizou-se siringaldazine como substrato enzimático. A mistura foi composta de 0,6 mL de sobrenadante; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 5,0); 0,1 mL de siringaldazine (0,1% em etanol); 0,1 mL de água destilada.

A oxidação de siringaldazine ( $\epsilon_{310}=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) até sua forma quinona foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm.

#### **4.14. DETERMINAÇÃO DE CITOCROMO P-450 EM TODA A CÉLULA (ASPERGER et al., 1999 - MODIFICADO)**

O cálculo para a quantificação de citocromo P-450 foi realizado de acordo com a equação abaixo.

$$C = \frac{A}{\epsilon \times L \times [P]}$$

Onde:

C = concentração de P-450 em mmoles  $\text{mg}^{-1}$  proteína

A = Diferença de absorvância entre 450 e 490 nm;

$\epsilon$  = Coeficiente de absorção molar ( $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ );

L = comprimento da luz que atravessa a cubeta

P = concentração de proteína

O citocromo P-450 foi determinado por espectro de varredura, usando  $\epsilon_{450-490}$  de  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  de acordo com OMURA e SATO (1964). Para isso a biomassa fúngica foi centrifugada e lavada duas vezes com tampão fosfato (0,1 M) pH 7,4. Após a lavagem a biomassa foi ressuspendida em 5 mL de tampão fosfato à 5°C (0,1 M) pH 7,2, contendo 0,25 M de sacarose, essa mistura ficou em sonicador durante 5 minutos e adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  de cianeto de potássio (0,5M). Após esse procedimento verteu-se essa solução em um cubeta acertou-se a linha de base, borbulhou-se CO durante 1 minuto (2 bolhas/segundo) e o espectro do cit P450 endogenicamente reduzido foi determinado. Subseqüentemente, adicionou-se uma pequena quantidade de ditionato de sódio na cubeta para determinação de cit P-450 totalmente reduzido.

Para a determinação de cit P-450 tratou-se a amostra com CO, detectando assim o sistema de enzima reduzido (redução realizada pelo NADPH endógeno), enquanto que após a adição de ditionato de sódio, determinou-se todo o sistema de enzima, ou seja, tanto o reduzido como o oxidado.

#### **4.15. ANÁLISE DOS COMPOSTOS DEGRADADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Para a quantificação da degradação dos compostos presentes nos sobrenadantes das culturas, estas foram submetidas à análise cromatográfica.

##### **4.15.1. EXTRAÇÃO DOS HAPs PARA ANÁLISE EM CLAE (LAUNEN et al., 1995)**

30 mL de caldo, junto com o micélio, foram acidificados para pH aproximado de 3-4 com ácido clorídrico (Carlo Erba). A este material adicionou-se 30 mL de acetato de etila (Mallinckrodt), deixando-se 12 horas, em condição estacionária, seguida por mais duas extrações consecutivas, sendo estas 3 frações reunidas. O extrato de acetato de etila foi evaporado em rotaevaporador e redissolvido em 30 mL de acetonitrila (Mallinckrodt).

##### **4.15.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**

A determinação da degradação foi realizada por CLAE, em um cromatógrafo da marca Shimadzu, utilizando-se coluna com fase reversa C18, ZORBAX ODS, 5  $\mu$ m, com dimensões de 15 cm x 4,6 mm. O volume injetado foi de 20  $\mu$ L. Usou-se um sistema isocrático de solventes como fase móvel, constituído por acetonitrila/água na proporção de 70:30 (v/v), a vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A detecção foi realizada em detector ultravioleta à 254 nm.

##### **4.15.3. PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO**

Preparou-se para cada composto, uma curva de calibração, sendo verificadas durante cada experimento, obtendo-se 3 ou mais pontos.

- **Naftaleno**

Para realizar a curva de calibração deste composto preparou-se soluções padrão, em 10 mL da fase móvel (m/v), nas seguintes concentrações 0,1%, 0,2%, 0,5% e 1,0%. A partir dos

valores obtidos da área dos cromatogramas, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = -14355517,1 + 173104159,4.X$  ( $r = 0,999$ ).

- **Antraceno**

A curva de calibração deste composto foi preparada em 10 mL de fase móvel (m/v), nas seguintes concentrações; 0,025%, 0,05%, 0,075% e 0,1%. A partir dos valores obtidos da área dos cromatogramas, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = 4169185,4 + 3875384.X$  ( $r = 0,989$ ).

- **Pireno**

Este composto foi quantificado através do preparo de soluções padrão em 10 mL de fase móvel (m/v), nas seguintes concentrações; 0,005%, 0,01% e 0,02%. A partir dos valores obtidos da área dos cromatogramas, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = -293213 + 122638828,6.X$  ( $r = 0,999$ ).

- **Benzo[a]pireno**

Para quantificar a degradação deste composto no meio de cultivo realizou-se uma curva de calibração, utilizando soluções padrão preparadas em 10 mL de fase móvel (m/v) de 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,03% e 0,05%. A partir dos valores obtidos da área dos cromatogramas, foi calculada a regressão linear e determinou-se que  $y = -29945,6 + 221544115,7.X$  ( $r = 0,999$ ).

#### **4.16. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR HAPS**

Este estudo foi realizado conforme descrito por ANDERSSON & HENRYSSON (1996), onde se utilizou solo arenoso, devido suas propriedades físicas, as quais facilitam o seu manuseio e também a extração dos HAPs. O solo foi dividido em duas frações:

1. uma fração não autoclavada, mantidas a 4°C em frascos estéreis;
2. uma fração autoclavada a 121°C, e após uma semana à temperatura ambiente foi autoclavada novamente e estocada a 4°C.

As duas frações foram contaminadas pelos HAPs (preparado como descrito no item 4.16.2) e misturada por um período total de 2 horas. Após evaporação dos solventes, as frações do solo foram vertidas nos Erlenmeyers contendo o pré inóculo e incubados a 30°C por um período de 8 semanas. As amostras foram retiradas a cada 2 semanas.

#### **4.16.1. PREPARO DO PRÉ INÓCULO**

As linhagens 984 e 1040 foram selecionadas para esta etapa por apresentarem melhor crescimento quando inoculadas em solo. Elas foram inoculadas em farelo de trigo: água (1:4), usando como inóculo micélio de 3 x 1 cm<sup>2</sup> e incubou-se por 3 dias a 30°C. Após este período o solo contaminado foi vertido nestes frascos e incubado por 8 semanas. Os controles foram preparados sem inóculo para a correção da perda abiótica dos compostos.

#### **4.16.2. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE HAPs PARA ESTUDOS COM SOLO**

Para naftaleno, pireno e benzo[a]pireno foi preparado a solução estoque em uma solução de hexano/acetona (3:1), na concentração final de 5%, 1,0% e 0,5% (v/v), respectivamente. O antraceno foi dissolvido em acetona numa concentração de 0,75% (v/v).

Foi adicionado no solo diferentes volumes da solução estoque, que variou entre 4,8 – 6,4 mL, obtendo-se assim uma concentração de 5 mg de naftaleno/ g solo; 1,0 mg de antraceno/g solo e 0,5 mg de pireno e/ou benzo[a]pireno/ g solo.

#### **4.16.3. EXTRAÇÃO DOS HAPs DO SOLO PARA ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO (ANDERSSON & HENRYSSON, 1996 - modificado)**

As amostras do solo foram retiradas a cada 2 semanas (tempo total de incubação de 60 dias) e colocadas em frascos de vidro onde foi adicionado 100 mL de tolueno e colocados em banho maria (100°C) por 3 horas. Quando os frascos atingiram a temperatura ambiente, 2 mL de tolueno de cada frasco foi filtrado em membrana de 0,22 µm e injetadas em CLAE, para análise da degradação.

#### 4.17. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICA DO SOLO

O solo foi caracterizado química e fisicamente pelo Instituto Agronômico (Centro de Solos e Recursos Agroambientais – Laboratório de Física do Solo). Este solo foi coletado da Fazenda experimental do Instituto Agronômico localizada em Pindorama. A coleta foi realizada em vários pontos aleatórios, com uma profundidade de aproximadamente 20 cm e as amostras foram misturadas, mantidas em câmara fria (20°C) até as análises serem realizadas.

**TABELA 2:** Análise química do solo

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| pH (água)                      | 6,5  |
| Cálcio (cmol)                  | 5,3  |
| Magnésio (cmo)                 | 1,2  |
| Potássio (cmol)                | 0,32 |
| Fósforo (mg dm <sup>-3</sup> ) | 26,0 |
| Carbono (g dm <sup>-3</sup> )  | 18,0 |
| Matéria Orgânica (%)           | 3,1  |
| Capacidade de Troca (cmol)     | 8,42 |
| Saturação Bases (%)            | 81,0 |

**TABELA 3:** Teor de umidade do solo

| Umidade (g g <sup>-1</sup> ) |       |
|------------------------------|-------|
| 350 KPa                      | 0,229 |
| 1500 KPa                     | 0,041 |

**TABELA 4:** Granulometria do solo

| Argila (%) | Silte (%)      | Areia Grossa (%) | Areia Fina (%) | Areia (%)     | Toatal | Classificação Textural |
|------------|----------------|------------------|----------------|---------------|--------|------------------------|
| < 0,002 mm | 0,053-0,002 mm | 2,00-0,210 mm    | 0,210-0,053 mm | 2,00-0,053 mm |        |                        |
| 10,03      | 5,30           | 44,22            | 40,46          | 84,68         |        | Areia Franca           |

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### ***EFEITO DO INÓCULO DE FUNGOS NA DEGRADAÇÃO DE HAPs E IDENTIFICAÇÃO DESSES AGENTES***

#### **5.1. ESTUDO DO EFEITO DO INÓCULO NA BIODEGRADAÇÃO DE HAPs**

Após 5 e 10 dias de cultivo, as amostras foram analisadas quanto a porcentagem de degradação por cromatografia, onde observou-se que as linhagens apresentaram degradação dos compostos estudados, quando variou-se o tamanho do inóculo.

#### ❖ Naftaleno

As amostras foram analisada por CLAE com cinco e dez dias de cultivo (Tabela 2) quanto à capacidade de degradação de naftaleno, através da CLAE.

**TABELA 5:** Efeito do tamanho do inóculo na degradação de naftaleno (0,5%) com 5 e 10 dias de crescimento.

| Linhagens          | Degradação (%)  | Degradação (%) |
|--------------------|-----------------|----------------|
|                    | 5 dias          | 10 dias        |
| 710 I <sup>A</sup> | NE <sup>B</sup> | 59,02          |
| 870 I              | 66,14           | 64,53          |
| 898 I              | NE              | 64,27          |
| 984 I              | NE              | 47,36          |
| 1040 I             | NE              | 32,54          |
| 710 II             | 1,33            | 4,5            |
| 870 II             | NE              | 28,0           |
| 898 II             | NE              | 54,66          |
| 984 II             | NE              | 50,47          |
| 1040 II            | 3,02            | 50,47          |
| 710 III            | 37,33           | NE             |
| 870 III            | NE              | NE             |
| 898 III            | 39,48           | NE             |
| 984 III            | 24,10           | NE             |
| 1040 III           | NE              | NE             |

**A:** Tamanho do inóculo adicionado ao meio de cultivo. (I) 1cm<sup>2</sup>; (II) 2 x 1cm<sup>2</sup>; (III) 3 x 1cm<sup>2</sup>. **B** NE Não estimado. Desvio Padrão <5%.

Após 5 dias de crescimento (Tabela 5), verificou-se que na presença de inóculo de  $1\text{cm}^2$  somente a linhagem 870 degradou este composto. Na presença de inóculos de  $2 \times 1\text{cm}^2$  somente duas linhagens (710 e 1040) apresentaram baixa degradação deste HAP, e as demais não apresentaram degradação. Quando inóculos de  $3 \times 1\text{cm}^2$  foram adicionados ao meio de cultura as linhagens apresentaram degradação deste composto, excetuando 870 e 1040. Após dez dias de crescimento observou-se alta degradação deste composto pelas linhagens aqui estudadas, principalmente quando inóculo de  $1\text{cm}^2$  foi adicionado ao meio de cultura. As mesmas linhagens apresentaram degradação na presença de inóculos de  $2 \times 1\text{cm}^2$ , sendo que a linhagem 1040 apresentou melhor degradação nesta condição. Estas linhagens não apresentaram degradação quando inóculos de  $3 \times 1\text{cm}^2$  foram adicionados ao meio de cultivo.

Assim observou-se que a melhor degradação de naftaleno pelas linhagens estudadas ocorreu no 10º dia de crescimento, e na presença de inóculo de  $1\text{cm}^2$ , exceto para a linhagem 1040 que apresentou melhor degradação na presença de inóculo de  $2 \times 1\text{cm}^2$ .

#### ❖ Antraceno

As amostras foram analisadas com cinco dias de cultivo (Tabela 6), quanto à capacidade de degradação de antraceno. Observou-se que as linhagens apresentaram melhor degradação quando o tamanho de inóculo utilizado foi de  $1\text{cm}^2$ , exceto a linhagem 870 que não apresentou degradação deste composto em nenhuma das condições estudadas. Após dez dias de cultivo observou-se que as linhagens apresentaram melhor degradação quando foi utilizado  $1\text{cm}^2$ ; na presença de  $2 \times 1\text{cm}^2$  nenhuma das linhagens apresentou degradação e na presença de  $3 \times 1\text{cm}^2$  todas as linhagens apresentaram alguma degradação deste composto, exceto a linhagem 898, que não foi capaz de degradar antraceno nesta condição.

Utilizando-se antraceno como substrato, as linhagens apresentaram melhor degradação com dez dias de crescimento e quando utilizou inóculo de  $1\text{cm}^2$ . Na presença de  $2 \times 1\text{cm}^2$  ou  $3 \times 1\text{cm}^2$  pouca ou nenhuma degradação foi observada, quando comparada com a degradação produzida na presença de inóculo de  $1\text{cm}^2$ .

**TABELA 6:** Degradação de antraceno (0,1%), com variação no tamanho de inóculo, com 5 e 10 dias de crescimento.

| <b>Linhagens</b>   | <b>Degradação (%)<br/>(5 dias)</b> | <b>Degradação (%)<br/>(10 dias)</b> |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 710 I <sup>A</sup> | 38,8                               | 34,2                                |
| 870 I              | NE                                 | 64,4                                |
| 898 I              | 31,7                               | 48,9                                |
| 984 I              | 21,0                               | 55,0                                |
| 1040 I             | 25,7                               | 33,3                                |
| 710 II             | 8,8                                | NE                                  |
| 870 II             | NE                                 | NE                                  |
| 898 II             | NE                                 | NE                                  |
| 984 II             | 8,9                                | NE                                  |
| 1040 II            | NE                                 | NE                                  |
| 710 III            | NE                                 | 12,1                                |
| 870 III            | NE                                 | 33,5                                |
| 898 III            | 1,4                                | NE                                  |
| 984 III            | NE                                 | 11,2                                |
| 1040 III           | NE                                 | 8,8                                 |

**A:** Tamanho do inóculo adicionado ao meio de cultivo. (I) 1cm<sup>2</sup>; (II) 2 x 1cm<sup>2</sup>; (III) 3 x 1cm<sup>2</sup>. **B.** NE Não estimado. Desvio Padrão <5%.

#### ❖ Pireno

Conforme a Tabela 7, observou-se que as linhagens apresentaram degradação deste composto. Com 5 dias de cultivo, o melhor tamanho de inóculo foi de 1 cm<sup>2</sup> para as linhagens, excetuando-se a linhagem 710 e 870 que apresentaram melhor degradação na presença de 3 x 1cm<sup>2</sup>. Com dez dias de cultivo as amostras foram analisadas e verificou-se que para as cinco linhagens estudadas o melhor tamanho de inóculo foi de 1cm<sup>2</sup>.

Na presença de pireno todas as linhagens apresentaram melhor degradação depois de dez dias de crescimento e na presença de inóculo de 1cm<sup>2</sup>. Quando inóculos de 2 x 1cm<sup>2</sup> ou 3 x 1cm<sup>2</sup> foram utilizados pouca ou nenhuma degradação foi detectada.

**TABELA 7:** Degradação de pireno (0,05%), com 5 e 10 dias de crescimento, com diferentes tamanhos de inóculo.

| <b>Linhagens</b>   | <b>Degradação (%)<br/>(5 dias)</b> | <b>Degradação (%)<br/>(10 dias)</b> |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 710 I <sup>A</sup> | NE <sup>B</sup>                    | 55,9                                |
| 870 I              | 3,8                                | 59,6                                |
| 898 I              | 50,9                               | 35,4                                |
| 984 I              | 24,6                               | 54,8                                |
| 1040 I             | 40,9                               | 52,3                                |
| 710 II             | NE                                 | 21,1                                |
| 870 II             | 16,7                               | 19,5                                |
| 898 II             | 10,5                               | NE                                  |
| 984 II             | 10,6                               | NE                                  |
| 1040 II            | 12,7                               | 22,1                                |
| 710 III            | 33,2                               | 39,7                                |
| 870 III            | 22,3                               | NE                                  |
| 898 III            | 9,8                                | 3,5                                 |
| 984 III            | 7,1                                | 42,8                                |
| 1040 III           | 10,3                               | 40,0                                |

**A:** Tamanho do inóculo adicionado ao meio de cultivo. (I) 1cm<sup>2</sup>; (II) 2 x 1 cm<sup>2</sup>; (III) 3 x 1 cm<sup>2</sup>.

**B.** NE Não estimado. Desvio Padrão <5%.

#### ❖ **Benzo[a]pireno**

As amostras foram analisadas com cinco dias de cultivo (Tabela 8), e observou-se que as linhagens não apresentaram degradação deste composto neste período de crescimento, somente a linhagem 870 apresentou degradação na presença de inóculos de 1cm<sup>2</sup> e 2 x 1cm<sup>2</sup>. Observou-se

que após dez dias, as linhagens apresentaram degradação deste composto nas três variações de inóculo, sendo que a melhor degradação ocorreu na presença de inóculo de 3 x 1cm<sup>2</sup>.

Quando benzo[a]pireno foi utilizado como substrato, verificou-se que as linhagens apresentaram melhor degradação com 10 dias de crescimento e na presença de inóculo de 3 x 1cm<sup>2</sup>.

**TABELA 8:** Degradação de benzo[a]pireno (0,05%), com diferentes quantidades de inóculo, com 5 e 10 dias de crescimento

| <b>Linhagens</b>   | <b>Degradação (%)<br/>(5 dias)</b> | <b>Degradação (%)<br/>(10 dias)</b> |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 710 I <sup>A</sup> | NE <sup>B</sup>                    | 19,1                                |
| 870 I              | 9,7                                | 71,5                                |
| 898 I              | NE                                 | 0                                   |
| 984 I              | NE                                 | 67,5                                |
| 1040 I             | NE                                 | 17,3                                |
| 710 II             | NE                                 | NE                                  |
| 870 II             | 17,8                               | 9,5                                 |
| 898 II             | NE                                 | 20,6                                |
| 984 II             | NE                                 | 28,3                                |
| 1040 II            | NE                                 | 58,7                                |
| 710 III            | NE                                 | 86,9                                |
| 870 III            | NE                                 | 81,8                                |
| 898 III            | NE                                 | 88,5                                |
| 984 III            | NE                                 | 87,5                                |
| 1040 III           | NE                                 | 83,3                                |

**A:** Tamanho do inóculo adicionado ao meio de cultivo. (I) 1cm<sup>2</sup>; (II) 2 x 1cm<sup>2</sup>; (III) 3 x 1cm<sup>2</sup>. **B.** NE Não estimado. Desvio Padrão <5%.

Após o estudo do efeito do inóculo na degradação dos HAPs, selecionou-se os melhores tamanhos de inóculo para cada linhagem em cada substrato, como mostrado na Tabela 9:

**TABELA 9:** Seleção do melhor tamanho de inóculo na degradação dos HAPs.

| <b>Linhagens</b> | <b>Naftaleno</b> | <b>Antraceno</b> | <b>Pireno</b>    | <b>Benzo[a]pireno</b> |
|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| 710              | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 3cm <sup>2</sup>      |
| 870              | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 3cm <sup>2</sup>      |
| 898              | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 3cm <sup>2</sup>      |
| 984              | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 3cm <sup>2</sup>      |
| 1040             | 2cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 1cm <sup>2</sup> | 3cm <sup>2</sup>      |

Observou-se (Tabela 9), que para naftaleno, antraceno e pireno a melhor porcentagem de degradação ocorreu quando utilizou inóculo de 1cm<sup>2</sup>, enquanto que benzo[a]pireno apresentou melhor taxa de degradação com inóculo de 3 x 1cm<sup>2</sup>.

As concentrações de HAPs utilizadas neste trabalho (naftaleno 0,5%, antraceno 0,1%, pireno e benzo[a]pireno 0,05%) são superiores às relatadas na literatura, de cinco a dez vezes, sendo que a degradação final foi igual ou maior do que as relatadas na literatura (RAVELET et al, 2000; ANDERSSON et al, 2000; PICKARD et al, 1999).

Os resultados mostram claramente que o tamanho do inóculo utilizado produziu efeito na porcentagem de degradação dos HAPs por estas linhagens. Os resultados mostrados neste estudo estão de acordo com DOMINGUES et al., 2000, onde o tamanho do inóculo teve influência na morfogênese do *Trichoderma reesei* Rut C-30 e na produção de celulase; assim, aumentando o tamanho do inóculo, peletes menores foram formados. Quando inóculo de aproximadamente 10<sup>5</sup> esporos/mL foi utilizado, a maioria dos peletes formados foram maiores do que com um inóculo de 10<sup>7</sup> esporos/mL, onde a maioria dos peletes formados foram pequenos, prevalecendo um crescimento disperso. De acordo com METZ & KOSSEN, 1997 a interação da hifa é importante na determinação de possibilidades para formação de peletes. Em altas concentrações, as hifas interagem entre si no estágio primário de crescimento, prevenindo o desenvolvimento de peletes.

O tamanho dos peletes é muito importante para a formação dos metabólitos secundários. A produção de nicomicina por *Streptomyces tendae* depende fortemente do tamanho dos peletes. Os precursores da nicomicina são produzidos por peletes pequenos e por micélio livre, enquanto a nicomicina “madura” é somente produzida por peletes grandes (BRAUN & VECHT-LIFSHITZ, 1991). O tamanho dos peletes é dependente do tamanho do inóculo em fungos filamentosos. A ocorrência e tamanho dos peletes são importantes em um grande número de processos industriais. A produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é dependente da ocorrência, mas também do tamanho dos peletes formados (JIMÉNEZ-TOBON et al, 1997).

JIMÉNEZ-TOBON et al. (1997), reportaram que para *P. chrysosporium* o tamanho médio de peletes foi reduzido com o aumento do inóculo. Isto foi causado porque em altas concentrações de esporos um grande número de esporos agregados é formado, levando a um aumento no número de peletes os quais param seu crescimento com um tamanho final pequeno influenciando negativamente a produção de MnP por este fungo.

SURESH & CHANDRASEKARAN (1999), reportaram um significativo aumento na produção de quitinase quando aumentou-se a concentração de inóculo do fungo *Beauveira bassiana*. Seus resultados também demonstraram que o tipo de inóculo influenciou a taxa de produção de enzima.

No estudo do efeito do inóculo na biodegradação de HAPs, observou-se que as linhagens apresentaram diferenças na degradação do mesmo composto como também uma mesma linhagem apresentou porcentagem de degradação diferente para os diferentes HAPs. Assim o melhor tamanho de inóculo para naftaleno, antraceno e pireno foi de 1 cm<sup>2</sup>, para as cinco linhagens estudadas, exceto a linhagem 1040 que na presença de naftaleno o inóculo selecionado foi de 2 x 1 cm<sup>2</sup>. Para benzo[a]pireno o tamanho de inóculo selecionado foi de 3 x 1 cm<sup>2</sup>.

## **5.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS UTILIZADAS NESTE TRABALHO**

As linhagens foram examinadas macroscopicamente (visualmente e utilizando-se lupa), por MEV e por microscopia de luz, para tentar sugerir a qual gênero estas linhagens pertencem.

### **5.2.1. Linhagem 710**

#### 5.2.1.1. Características macroscópicas (Figura 9 A)

Colônia com textura compacta, rugosa, de cor branca amarelada. O reverso da colônia não é colorido.

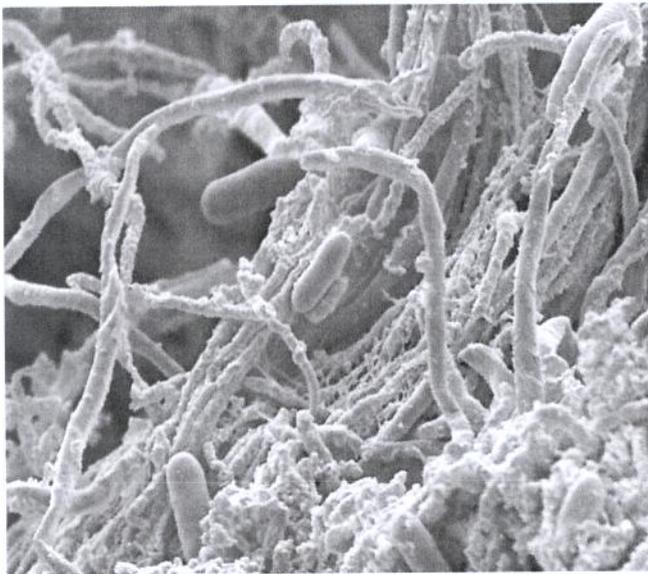
#### 5.2.1.2. Característica microscópica (Figura 9 B e C)

Hifa hialina, septada e finas. As hifas vegetativas possuem a forma de “cordas”. As fiálides são eretas formadas diretamente nas hifas, sendo separadas por um septo. No ápice da fiálide encontram-se os conídios hialinos. Estes geralmente aparecem em grupo. Os conídios estão ligados por um material gelatinoso, podendo se apresentar de forma unicelular.

Após observações pode-se sugerir o gênero da linhagem 710 como *Acremonium*, pois ele se enquadra nas descrições acima.



A



B



C

**FIGURA 9:** Linhagem *Acremonium* sp. (710). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo.

### **5.2.2. Linhagem 870**

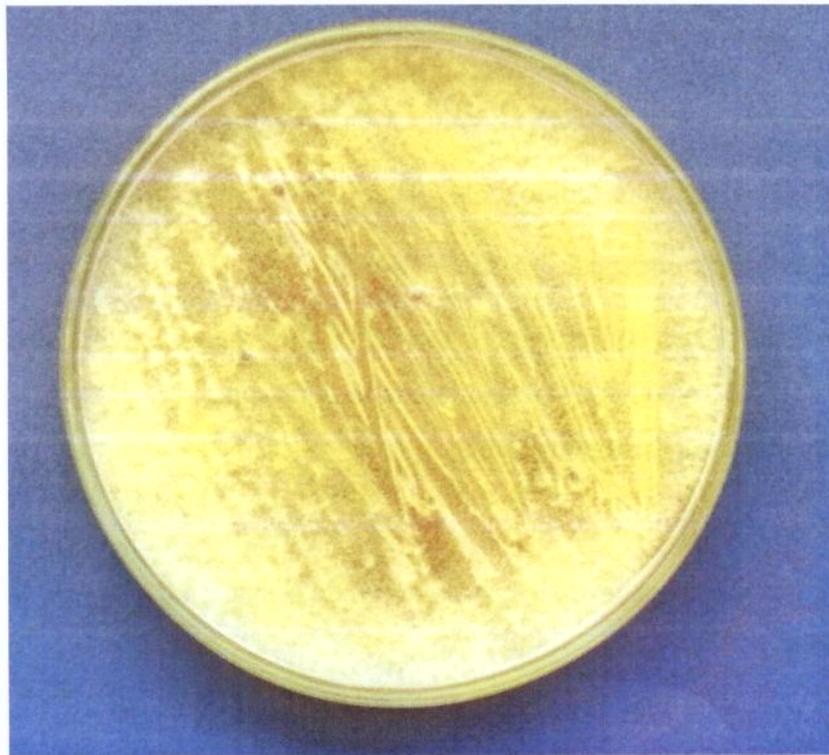
#### 5.2.2.1. Características macroscópicas (Figura 10 A)

Colônias de crescimento rápido, cotonosas com tufos esverdeados mais escuros.

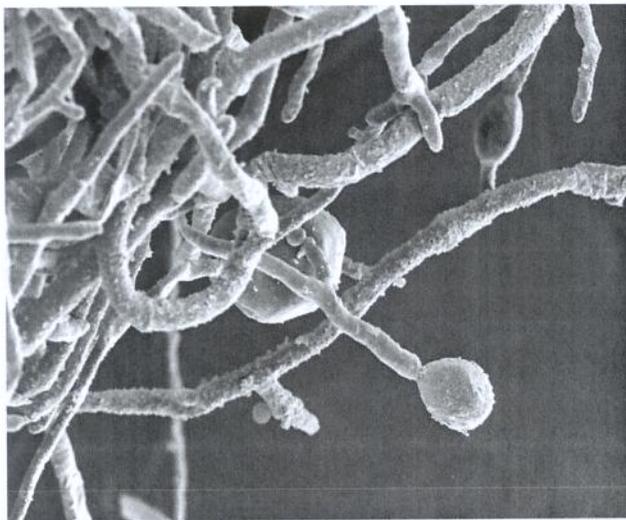
#### 5.2.2.2. Característica microscópica (Figura 10 B e C)

Os conidióforos são solitários ou podem ocorrer em tufos compactos, usualmente eretos. As fiálides hialinas possuem a porção central volumosa. Os conídios são subglobulosos para alongados hialinos a verde e aparecem agrupados no ápice das fiálides.

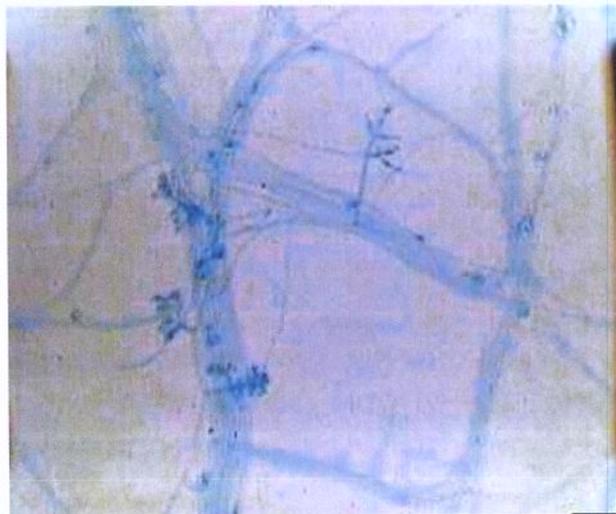
Pode-se sugerir o gênero da linhagem 870 como *Trichoderma*, pois ele se enquadra nas descrições acima.



A



B



C

**FIGURA 10:** Linhagem *Trichoderma* sp. (870). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo.

### **5.2.3. Linhagem 898**

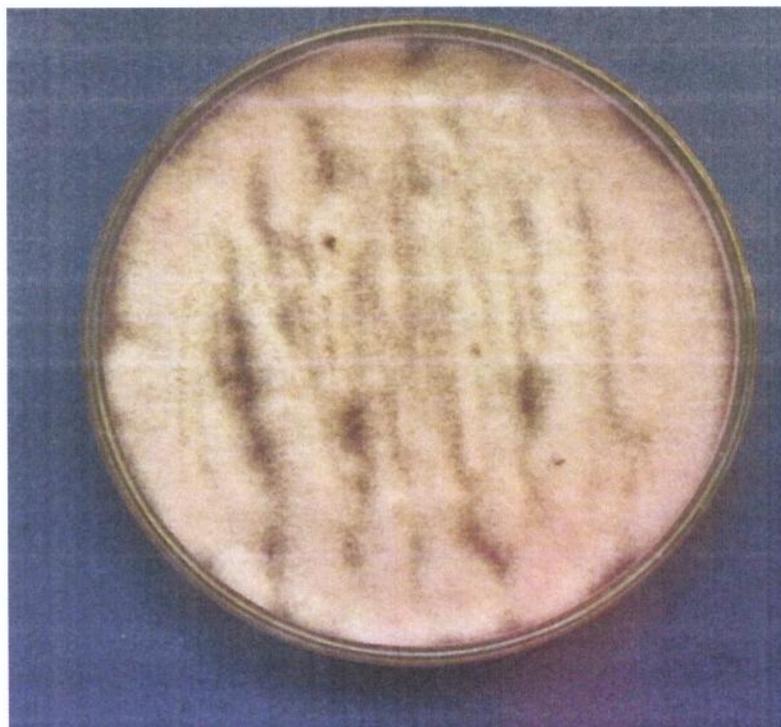
#### 5.2.3.1. Características macroscópicas (Figura 11 A)

Colônias de crescimento rápido, cotonosa, plana de coloração branca a rosada.

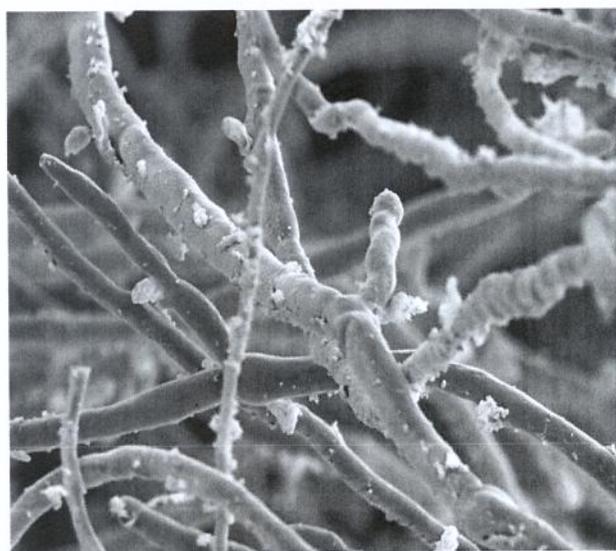
#### 5.2.3.2. Característica microscópica (Figura 11 B e C)

Fiálides cilíndricas, solitárias. Os macroconídios são septados, lisos, fusiformes. Os macroconídios não são septados ou ocasionalmente apresentam 1 septo, lisos, hialinos, ovóide a cilíndricos agrupados (ocasionalmente em cadeias).

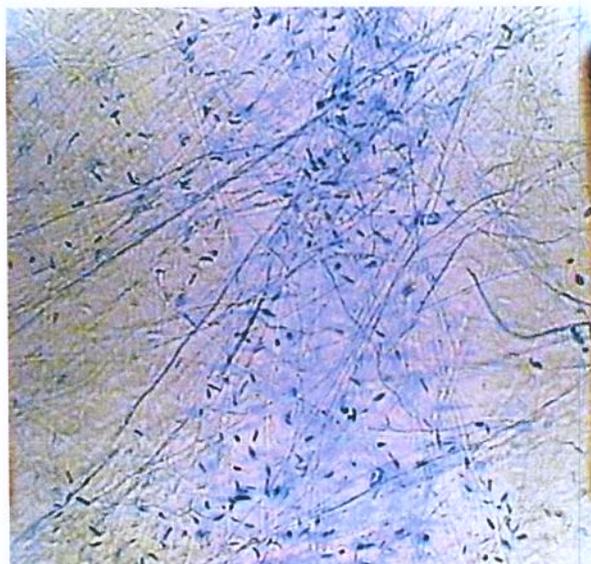
Após observações podemos sugerir o gênero da linhagem 898 como *Fusarium*, pois ele se enquadra nas descrições acima.



A



B



C

**FIGURA 11:** Linhagem *Fusarium* sp. (898). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo

#### **5.2.4. Linhagem 984**

##### 5.2.4.1. Características macroscópicas (Figura 12 A)

Colônias de crescimento rápido, inicialmente com uma coloração branca e escurecendo após o aparecimento dos esporos, se tornando cinza a preto.

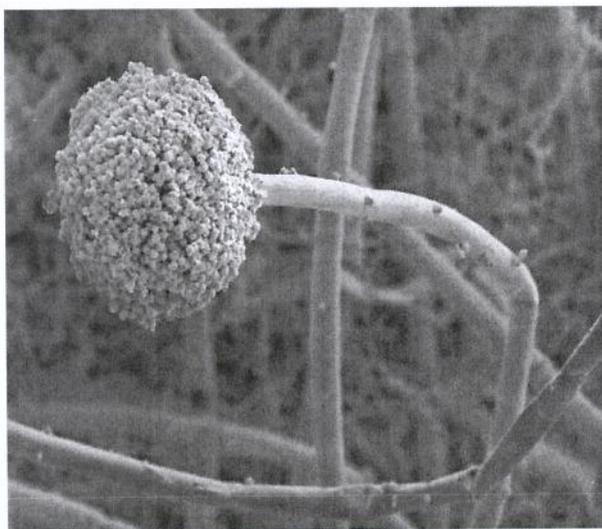
##### 5.2.4.2. Característica microscópica (Figura 12 B e C)

As hifas são septadas e hialinas. Apresenta vesícula (característico de *Aspergillus* spp). As fiálides cobrem toda a superfície da vesícula (radiados). Conídeos globosos, escuros.

Após observações pode-se sugerir o gênero da linhagem 984 como *Aspergillus*, pois ele se enquadra nas descrições acima.



A



B



C

**FIGURA 12:** Linhagem *Aspergillus* sp. (984). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo.

### **5.2.5. Linhagem 1040**

#### 5.2.5.1. Características macroscópicas (Figura 13 A)

Colônia de crescimento rápido, cotonosa de coloração branca.

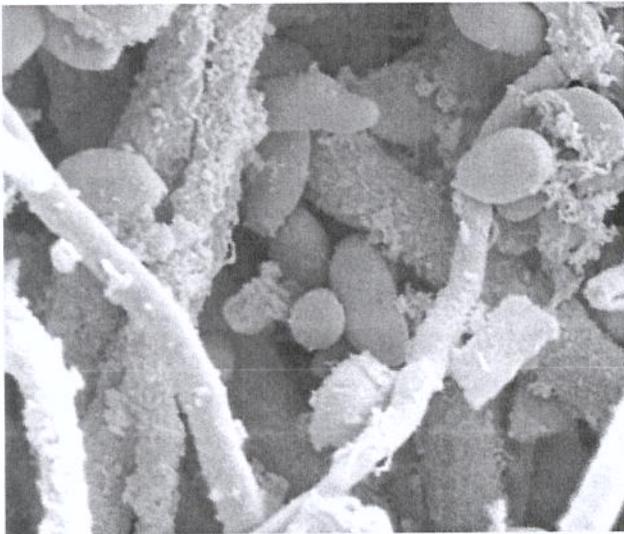
#### 5.2.5.2. Característica microscópica (Figura 13 B e C)

Os conidióforos são eretos, hialinos pigmentados, simples ou ramificados. A ramificação é de forma verticilar. As fiálides são longeniformes, hialinas. Os conídios são unicelulares, hialinos, ovóides.

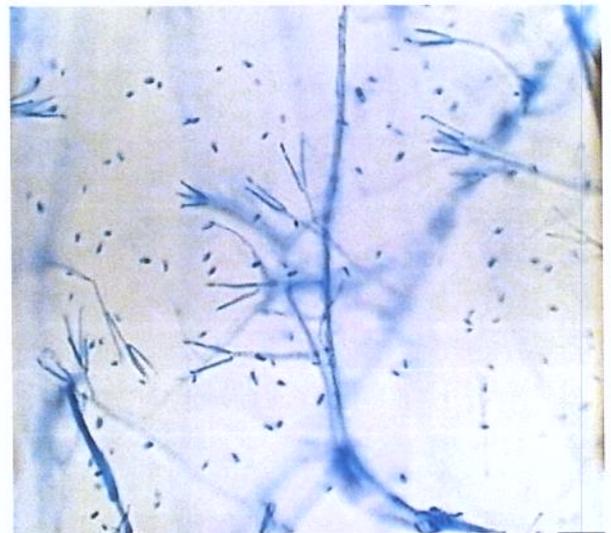
Após observações pode-se sugerir o gênero da linhagem 1040 como *Verticillium*, pois ele se enquadra nas descrições acima.



A



B



C

**FIGURA 13:** Linhagem *Verticillium* sp. (1040). A. Observação macroscópica; B. Microscopia eletrônica de varredura; C. Microcultivo.

Conforme resultado obtido após análise tanto por MEV e microscopia de luz sugere-se os seguintes gêneros para as linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho:

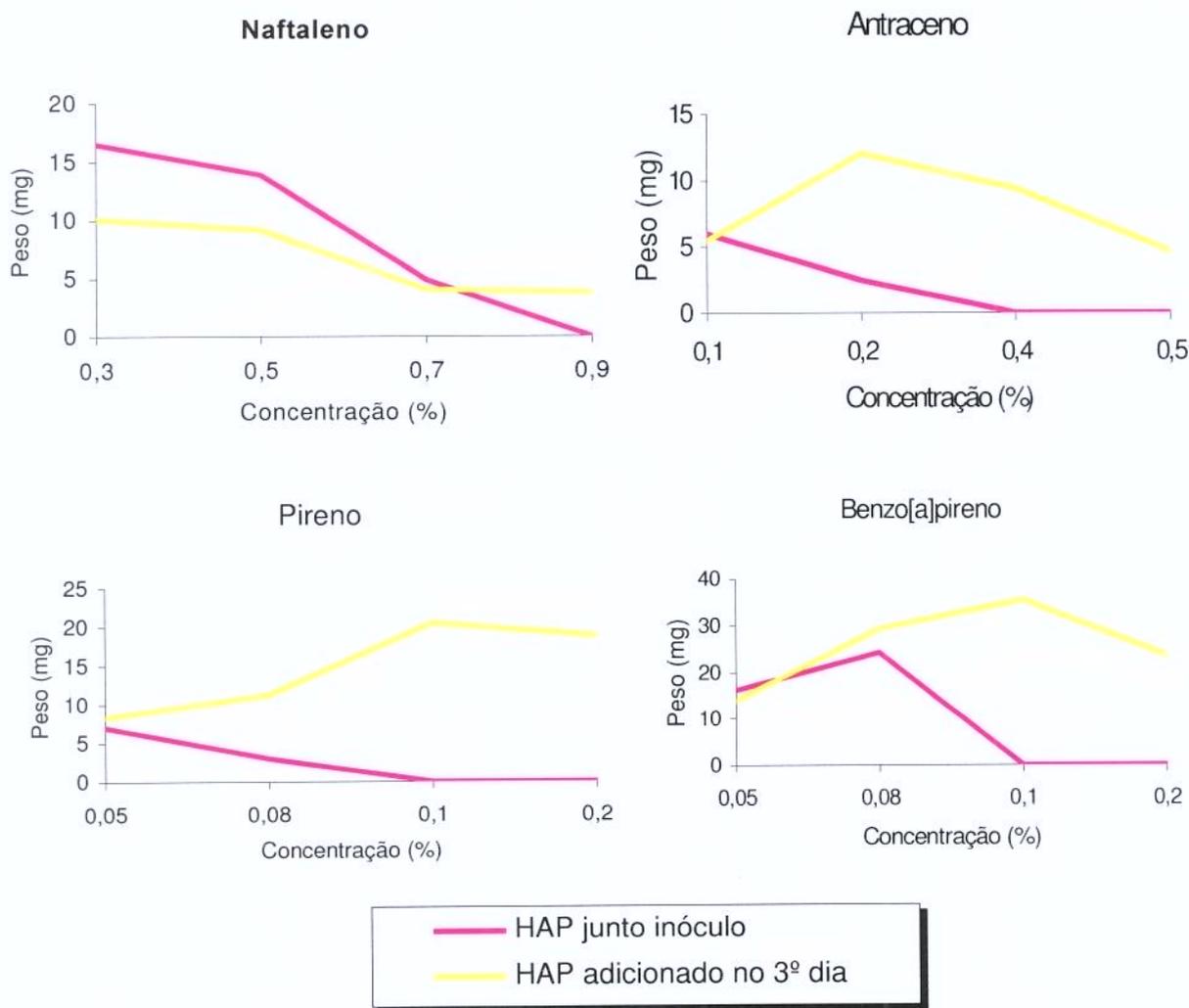
- ❖ 710 => *Acremonium* sp.
- ❖ 870 => *Trichoderma* sp.
- ❖ 898 => *Fusarium* sp.
- ❖ 984 => *Aspergillus* sp.
- ❖ 1040 => *Verticillium* sp.

**CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM HAPs**

**5.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS HAPs NO CRESCIMENTO FÚNGICO**

**5.3.1. Determinação da massa seca**

As Figuras abaixo mostram a massa seca obtida após crescimento das linhagens em diferentes concentrações de HAPs por 30 dias, quando o composto foi adicionado junto com o inóculo e por 33 dias quando o composto foi adicionado no 3º dia de crescimento.



**FIGURA 14:** Massa seca produzida por *Acremonium* sp utilizando-se como substrato os HAPs nas diferentes concentrações.

Após o crescimento desta linhagem nos 4 tipos de HAPs e nas diferentes concentrações, pode-se observar que o fungo *Acremonium* sp (Fig.14) produziu maior quantidade de massa seca quando comparada com o controle (6,4 mg para 1 cm<sup>2</sup> e 18,6 mg para 3 x 1cm<sup>2</sup>). Quando os HAPs foram adicionados ao meio juntamente com o inóculo, na presença de naftaleno esta linhagem teve seu crescimento inibido na concentração de 0,9%, para antraceno 0,4%, pireno 0,1% e benzo[a]pireno 0,1%. Não houve inibição total do crescimento quando os compostos foram adicionados no 3º dia de crescimento e sim uma diminuição na produção de massa seca quando aumentou-se as concentrações, exceto na presença de pireno.

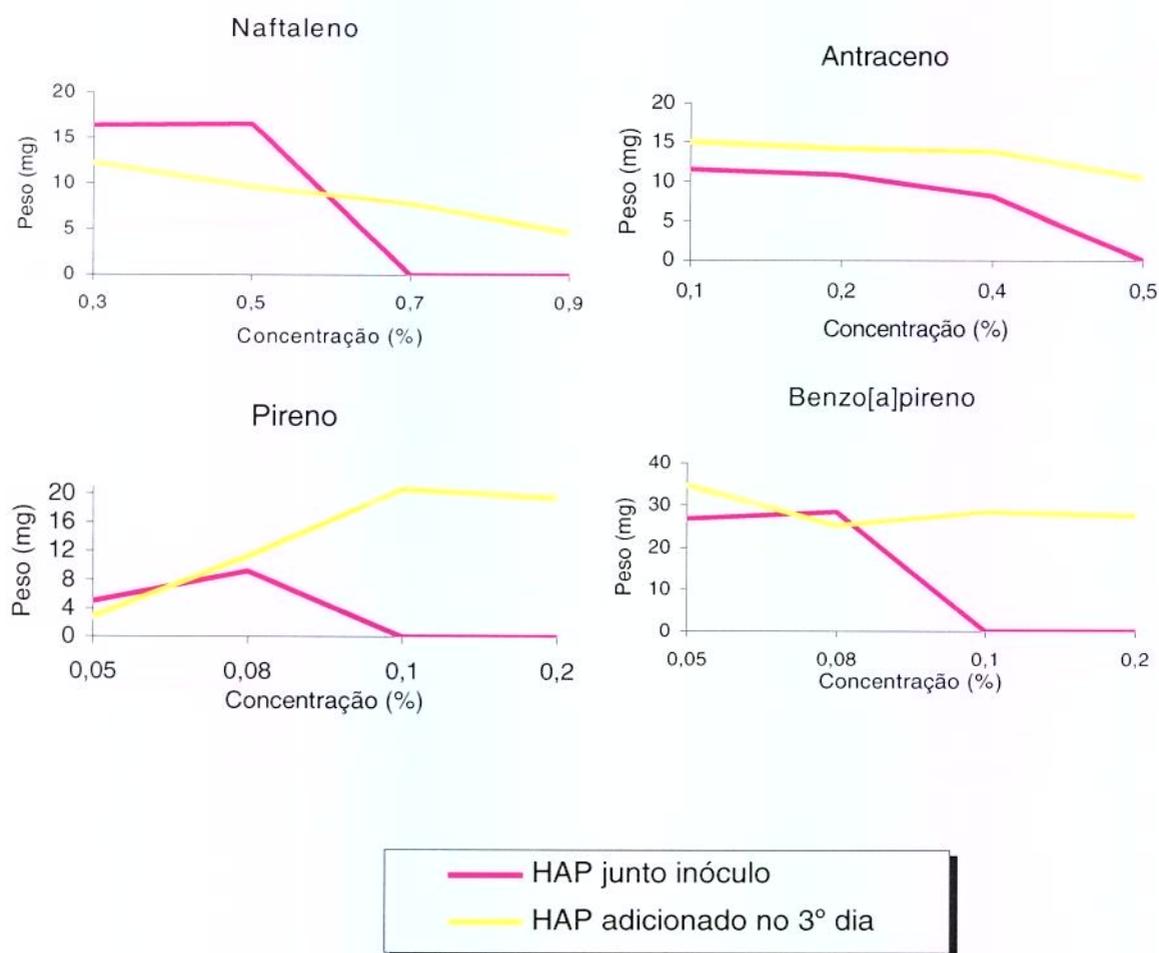
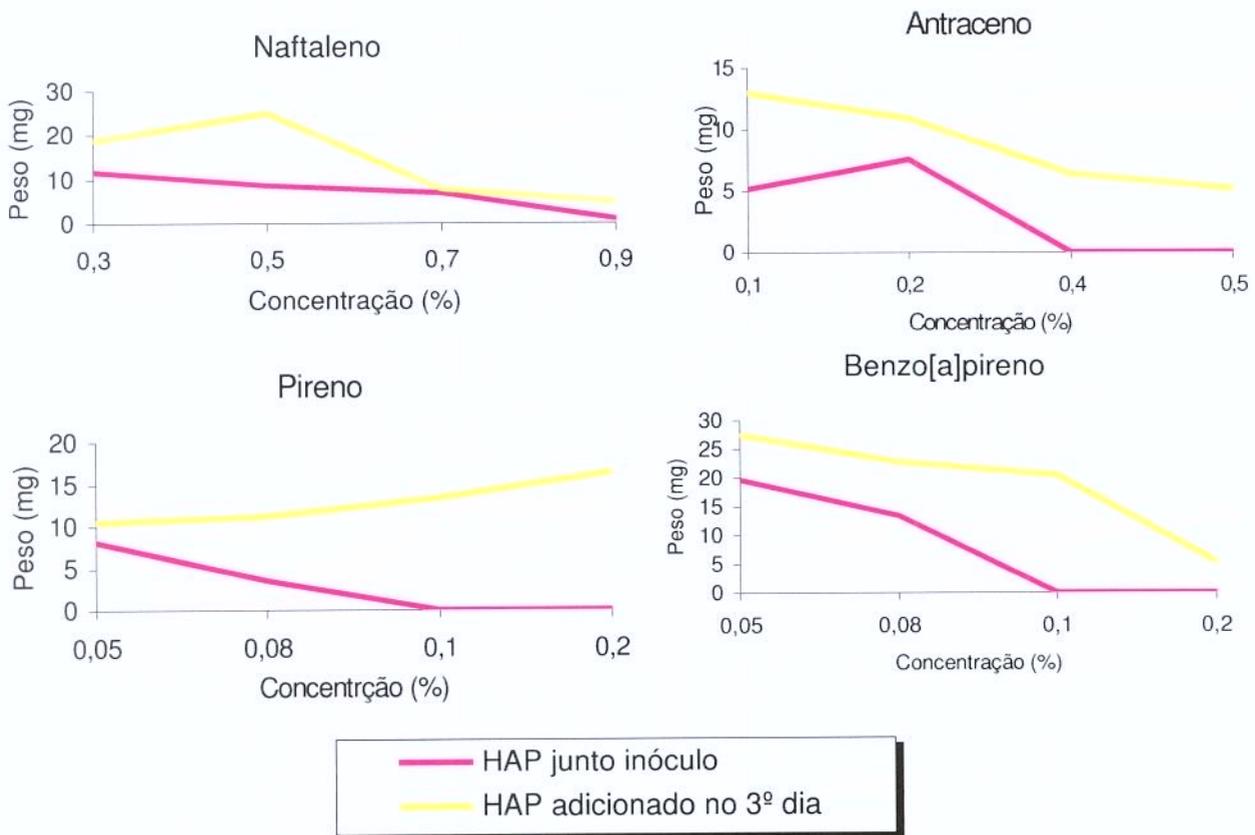


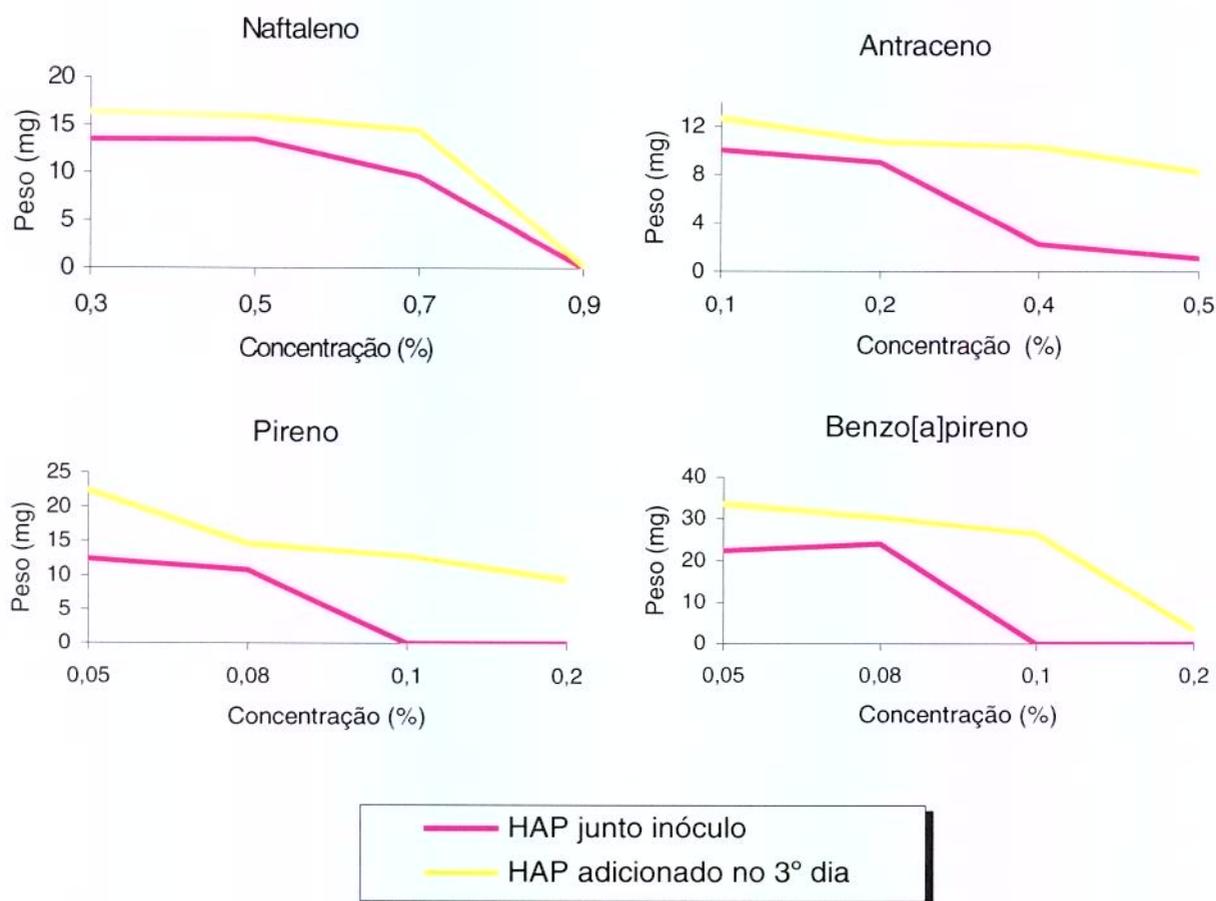
FIGURA 15: Massa seca produzida pelo fungo *Trichoderma* sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações.

Quando o fungo *Trichoderma* sp (Fig. 15) foi crescido nos HAPs com diferentes concentrações verificou-se que, quando os substratos foram adicionados junto com o inóculo ou no 3º dia, esta linhagem obteve um crescimento maior quando comparada com o controle (3,8 mg para 1cm<sup>2</sup> e 23,4 mg para 3 x 1cm<sup>2</sup>). Quando os compostos foram adicionados junto com o inóculo, na presença de naftaleno, pireno e benzo[a]pireno nas concentrações de 0,7, 0,1 e 0,1%, respectivamente. Seu crescimento foi inibido, na presença de antraceno na concentração de 0,5%. Não houve inibição total de crescimento quando os compostos foram adicionados no 3º dia de crescimento e sim uma diminuição na produção de massa seca quando aumentou-se as concentrações, exceto na presença de pireno.



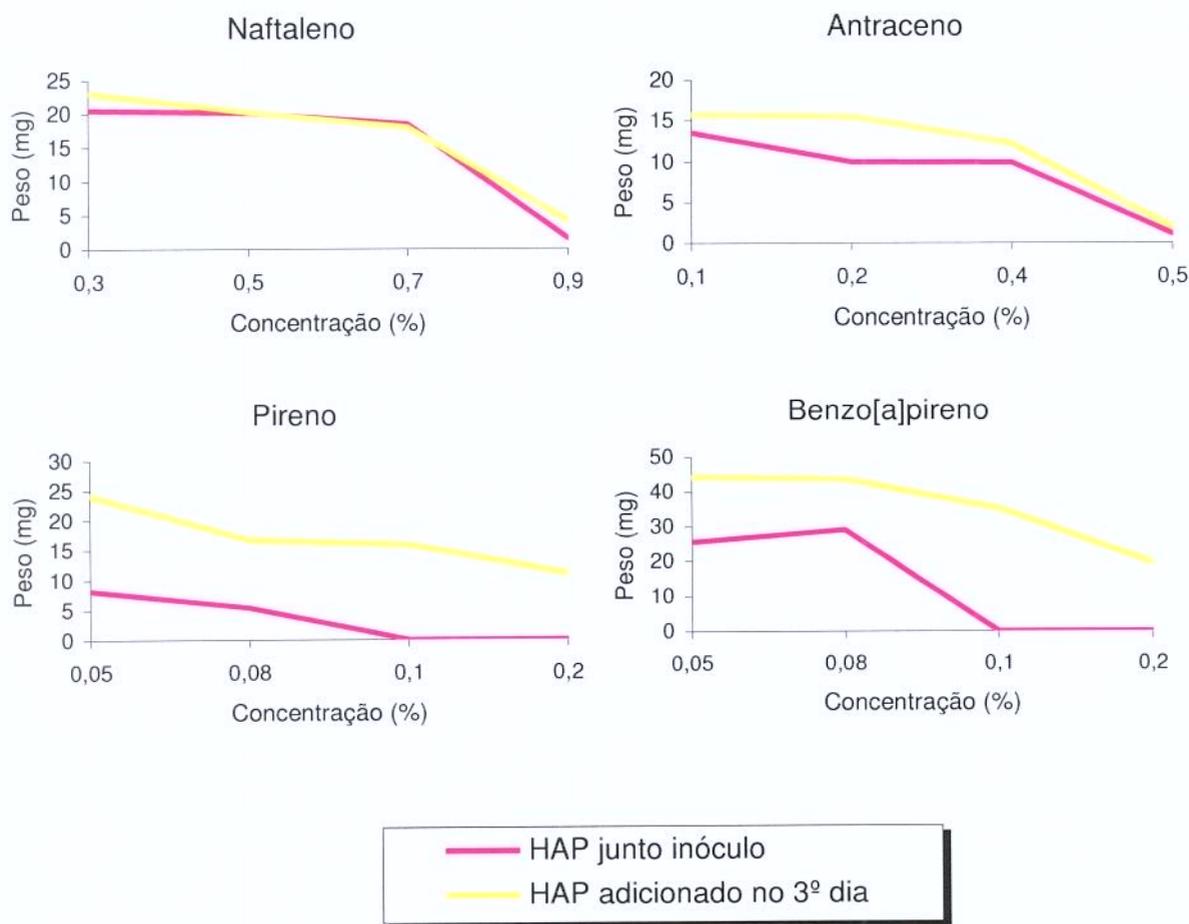
**FIGURA 16:** Massa seca produzida pelo fungo *Fusarium* sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações.

A linhagem *Fusarium* sp (Fig. 16) quando crescida nos HAPs aqui estudados apresentou maior produção de massa seca na presença dos substratos, quando comparada com o controle (3,5 mg para 1cm<sup>2</sup> e 28,1 mg para 3 x 1cm<sup>2</sup>), sendo que quando os HAPs foram adicionados ao meio no 3º dia a produção de massa seca foi ainda maior. Esta linhagem teve seu crescimento inibido, adição dos compostos junto com o inóculo, na presença de antraceno, pireno e benzo[a]pireno, quando adicionou-se as concentrações de 0,4, 0,1 e 0,1% respectivamente. Na presença de naftaleno o crescimento foi inibido somente quando adicionou 0,9%. Não houve inibição total do crescimento quando os compostos foram adicionados no 3º dia de crescimento e sim uma diminuição na produção de massa seca quando aumentou-se as concentrações, exceto na presença de pireno.



**FIGURA 17:** Massa seca produzida pelo fungo *Aspergillus* sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações.

Quando a linhagem *Aspergillus* sp (Fig.17) foi crescida nos substratos em diferentes concentrações verificou-se que houve maior crescimento após adicionar os substrato quando comparada com o controle (12,1 mg para 1cm<sup>2</sup> e 30,8 mg para 3 x 1cm<sup>2</sup>). Quando o composto foi adicionado junto com o inóculo, observou-se que na presença de naftaleno 0,9% houve inibição do crescimento; para antraceno não houve inibição de crescimento, mas a produção de massa seca diminuiu significativamente nas concentrações de 0,4 e 0,5%; utilizando os compostos pireno e benzo[a]pireno nas concentrações de 0,1 e 0,2% houve inibição do crescimento desta linhagem. Não houve inibição total de crescimento quando os compostos foram adicionados no 3º dia de crescimento e sim uma diminuição na produção de massa seca quando houve aumentou das concentrações.



**FIGURA 18.** Massa seca produzida pelo fungo *Verticillium* sp utilizando como substrato os HAPs nas diferentes concentrações.

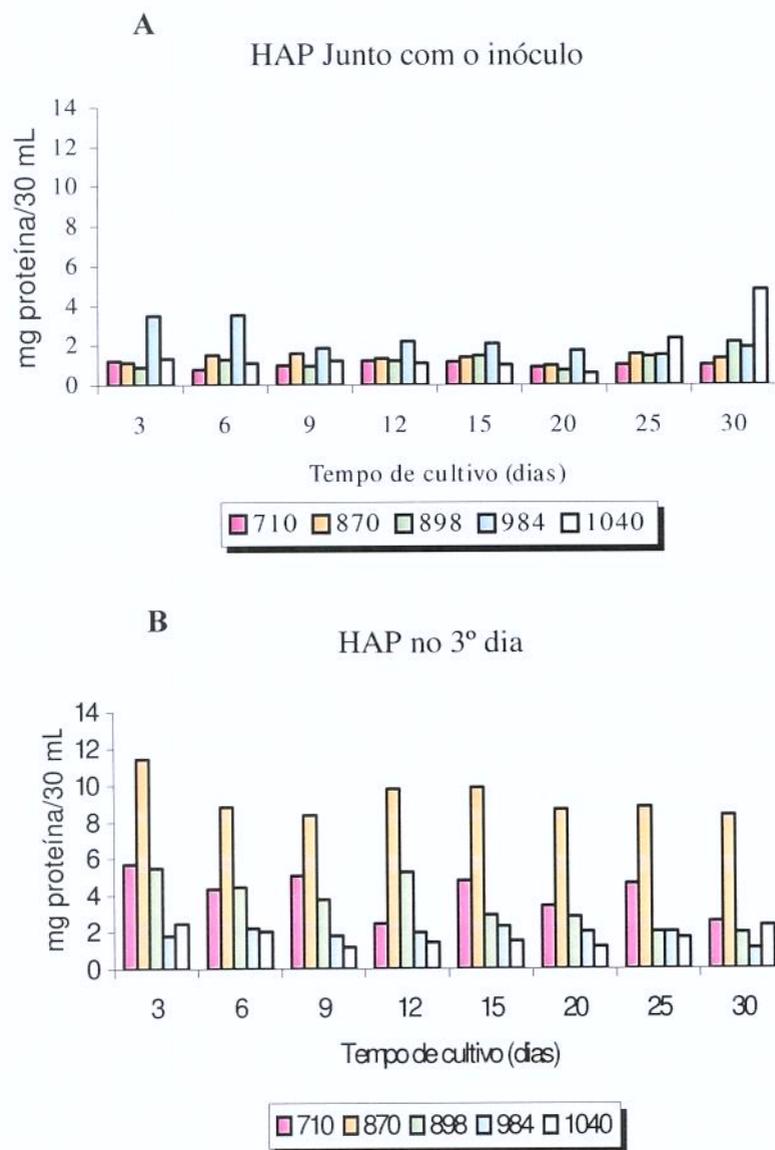
Após o crescimento da linhagem *Verticillium* sp (Fig. 18) nos HAPs utilizados observou-se que o crescimento das linhagens controle (13,9 mg para 1cm<sup>2</sup>, 20,5 mg para 1 x 2cm<sup>2</sup> e 29,3 mg para 3 x 1cm<sup>2</sup>) foi menor quando comparado com a linhagem utilizando os substratos. Quando o composto foi adicionado ao meio de cultivo no 3º dia a produção de massa seca foi maior do que quando adicionado junto com o inóculo. Quando a adição ocorreu junto com o inóculo, na presença de naftaleno não houve inibição do crescimento, mas uma diminuição significativa utilizando a concentração de 0,9%, já com antraceno observa-se que houve inibição do crescimento na concentração de 0,5%. Quando se utilizou pireno e benzo[a]pireno houve inibição do crescimento nas concentrações de 0,1 e 0,2%. Não houve inibição total de crescimento quando os compostos foram adicionados no 3º dia de crescimento e sim uma diminuição na produção de massa seca, principalmente quando naftaleno e antraceno foram utilizados como substratos, quando houve aumento das concentrações.

### 5.3.2. PROTEÍNA MICELIAL

A quantificação da proteína micelial esta relacionada com o crescimento fúngico, portanto quanto maior a concentração de proteína micelial maior será o crescimento das linhagens.

#### 5.3.2.1. Adição do naftaleno juntamente com o inóculo ou no 3º dia de cultivo

As linhagens foram crescidas neste HAP (0.5%) durante 30 dias e a adição deste composto ocorreu juntamente com o inóculo e no 3º dia de crescimento totalizando 33 dias de crescimento.



**FIGURA 19:** Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em naftaleno 0,5%.

Observou-se que a produção de proteína micelial (Figura. 19A) foi maior com 30 dias de cultivo para as linhagens *Fusarium* sp (898) (2,17 mg) e *Verticillium* sp (1040) (4,83 mg), enquanto que a linhagem *Aspergillus* sp (984) mostrou maior produção de proteína no 3º (3,5 mg) e 6º (3,52 mg) dia de cultivo. As linhagens *Acremonium* sp (710) e *Trichoderma* sp (870) mostraram valores aproximados de proteína em todos os dias analisados (0,78 – 1,23 mg e 0,98 – 1,59 mg, respectivamente).

De acordo com a Figura 19B, a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou os maiores valores de proteína na presença de naftaleno (0,5%), sendo o valor máximo obtido no 3º dia de cultivo (11,43 mg), enquanto que as demais linhagens apresentaram valores próximos de proteína durante os 30 dias analisados (1,12 – 5,71 mg).

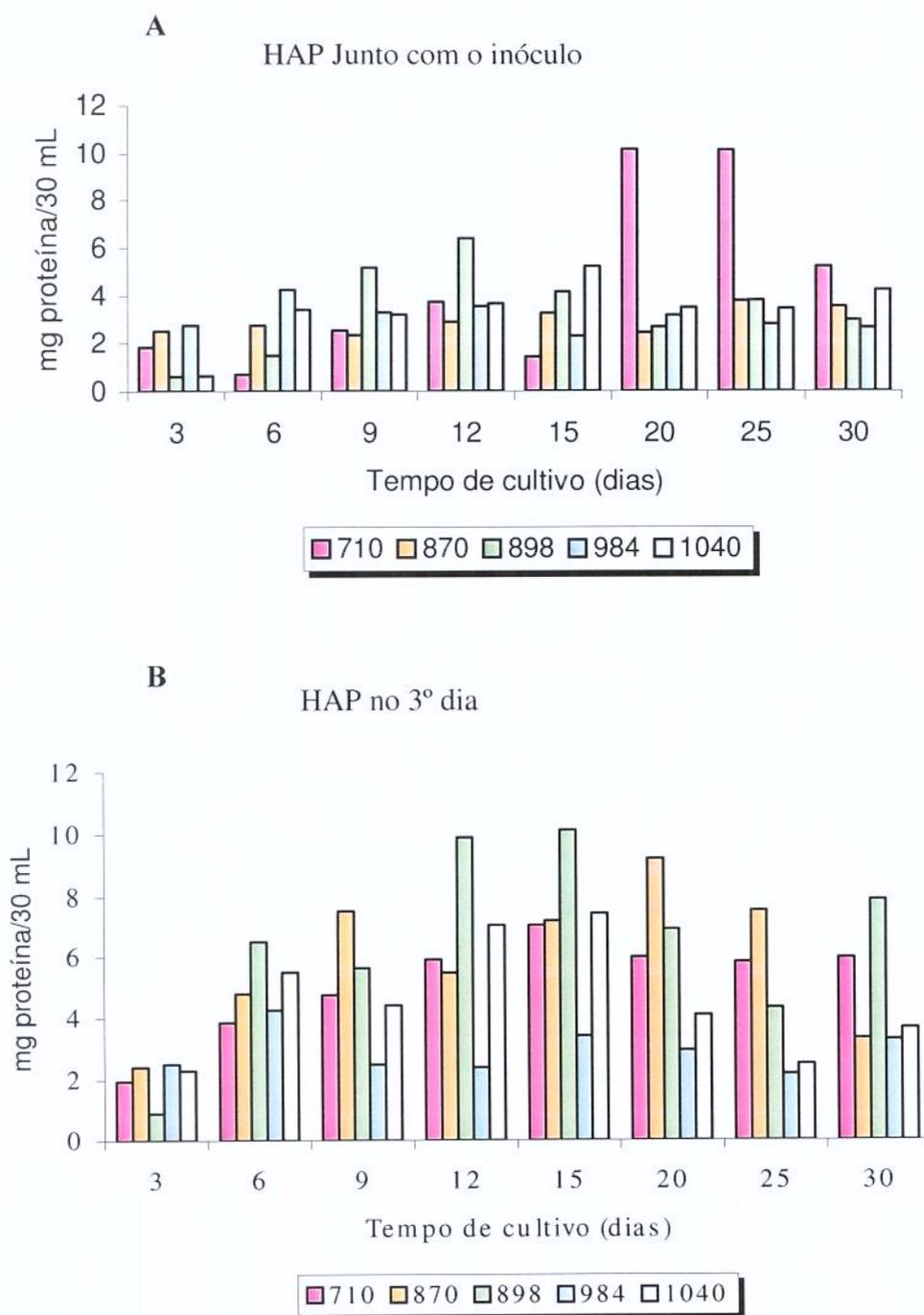
Observando as Figuras 19A e 19B pode se verificar que quando o naftaleno foi adicionado após 3 dias de cultivo possibilitou um maior crescimento fúngico.

#### **5.3.2.2. Adição do antraceno juntamente com o inóculo ou no 3º dia de cultivo**

As linhagens foram crescidas em antraceno 0,1% sendo que a adição deste composto foi realizada juntamente com o inóculo durante 30 dias ou no 3º dia de cultivo totalizando 33 dias de crescimento.

A avaliação do crescimento fúngico quando adicionando o composto e o inóculo juntos, (Figura 20A), todas as linhagens estudadas apresentaram produção de proteína micelial. A linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou maior concentração de proteína com 20, 25 e 30 dias (10,20 mg, 10,15 mg e 5,24 mg, respectivamente). As demais linhagens também apresentaram proteína em todos os dias, mas em menor valor (entre 0,62 mg a 6,40 mg).

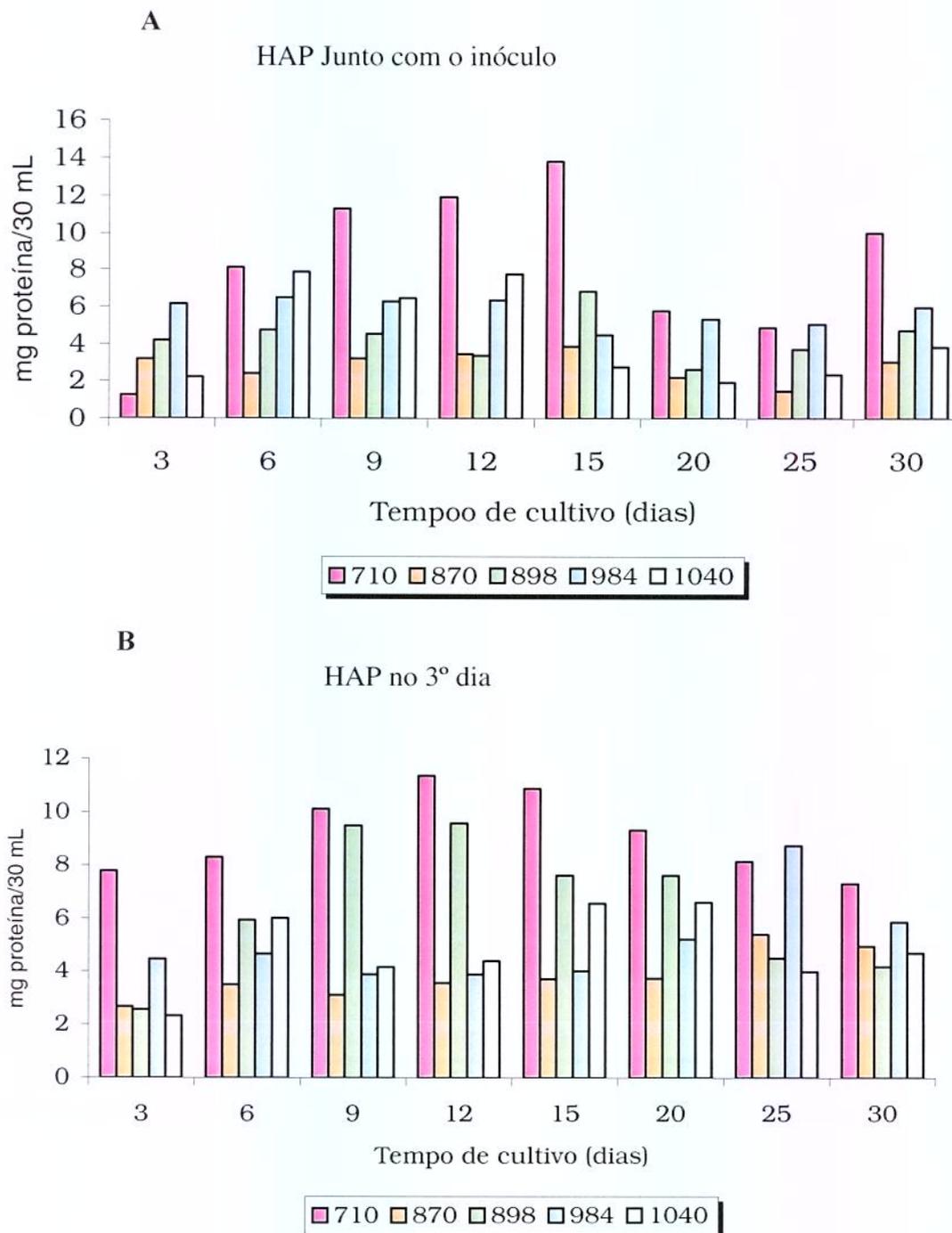
De acordo com a Figura 20B, observou-se que a produção de proteína micelial foi maior entre os dias 12º ao 20º dia de crescimento, exceto para a linhagem *Aspergillus* sp (984) (4,26 mg) a qual apresentou melhor produção de proteína com 6 dias. Sendo que as linhagens *Fusarium* sp (898), e *Trichoderma* sp (870) foram as que mais apresentaram crescimento micelial (10,15 mg e 9,24 mg, respectivamente).



**FIGURA 20:** Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em antraceno 0,1%.

### 5.3.2.3.. Adição do pireno juntamente com o inóculo ou no 3º dia de cultivo

As linhagens foram crescidas em pireno 0,05% com adição juntamente com o inóculo durante 30 dias ou no 3º dia de crescimento totalizando 33 dias de crescimento.



**FIGURA 21:** Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em pireno 0,05%.

De acordo com a Figura 21A, observou-se que todas as linhagens produziram proteína micelial, sendo que o pico máximo de produção foi obtido com a linhagem *Acremonium* sp (710) com 15 dias de crescimento (13,8 mg).

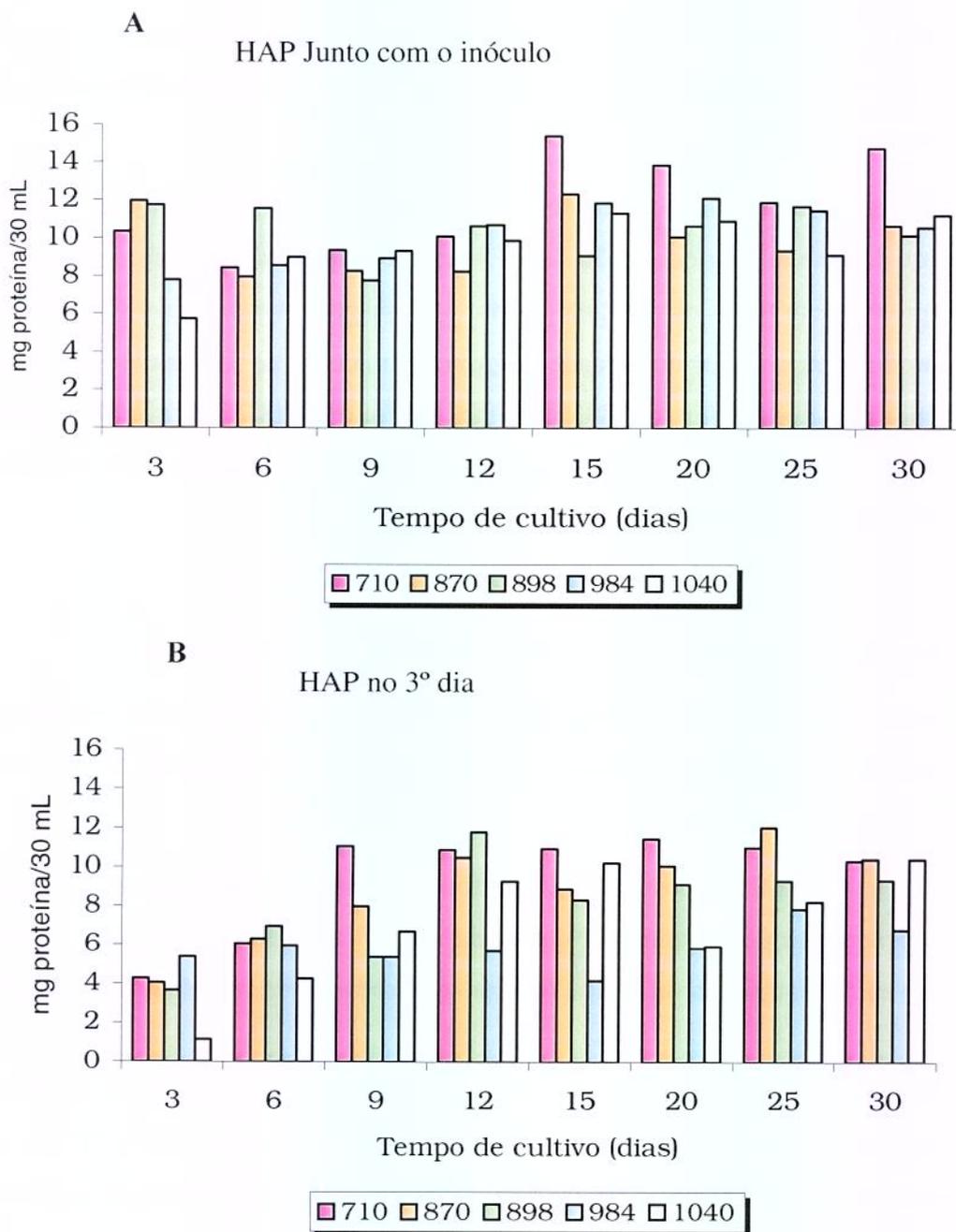
A Figura 21B mostra a produção de proteína micelial produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, durante um período de 30 dias. Observou-se que todas as linhagens foram capazes de produzir proteína em todos os dias analisados. As linhagens *Acremonium* sp (1040) e *Fusarium* sp (898) produziram a maior quantidade de proteína micelial no 12º dia (11,38 mg e 9,60 mg). Já para a linhagem *Aspergillus* sp (984), o melhor dia foi o 25º (8,76 mg). As linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram níveis semelhantes de proteína durante todos os dias analisados (2,34 mg – 6,63 mg, respectivamente).

#### **5.3.2.4. Adição do benzo[a]pireno juntamente com o inóculo ou no 3º dia de cultivo**

As linhagens foram crescidas em benzo[a]pireno 0,05% com adição deste composto juntamente com o inóculo durante 30 dias e no 3º dia de crescimento totalizando 33 dias de crescimento.

De acordo com a Figura 22A, observou-se que todas as linhagens produziram proteína micelial. A maior concentração de proteína foi detectada no 15º e 20º dia de cultivo, onde a linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou o pico máximo da produção de proteína micelial com 15 dias (15,39 mg).

Conforme verificou-se na Figura 22B todas as linhagens foram capazes de produzir proteína micelial, sendo que a melhor produção desta, foi obtida no período do 12º ao 25º dia. O pico máximo de produção de proteína micelial foi obtido com as linhagens *Fusarium* sp (898), com 12 dias de cultivo e *Trichoderma* sp (870) com 25 dias de crescimento (11,80 mg e 10,49 mg, respectivamente).



**FIGURA 22:** Produção de proteína micelial, após crescimento das linhagens em benzo[a]pireno 0,05%.

Observou-se que quando aumentou a concentração dos HAPs, inibiu o crescimento das linhagens. Quando os compostos foram adicionados ao meio junto com o inóculo verificou-se que, na presença de naftaleno, o HAP mais simples, na concentração de 0,9% teve efeito

inibitório para as linhagens. Quando utilizou-se antraceno, este apresentou efeito inibitório a partir da concentração de 0,4% para as linhagens *Acremonium* sp (710), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984). Para pireno e benzo[a]pireno, os HAPs mais complexos, a concentração inibitória foi de 0,1% para as cinco linhagens. Quando os compostos foram adicionados ao meio no 3º dia de cultivo, verificou-se que as linhagens não tiveram seu crescimento totalmente inibido, mas uma queda na produção micelial.

Quanto à proteína micelial observou-se que a produção desta foi maior quando o composto foi adicionado no 3º dia de crescimento para naftaleno, antraceno, pireno e benzo[a]pireno, sendo que o máximo de proteína detectada para os fungos testados foi entre o período de 15 a 25 dias de cultivo, após esse período as linhagens apresentaram uma diminuição da produção de proteína micelial.

## MECANISMOS ENZIMÁTICOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE HAPs

### 5.4. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE HAPs

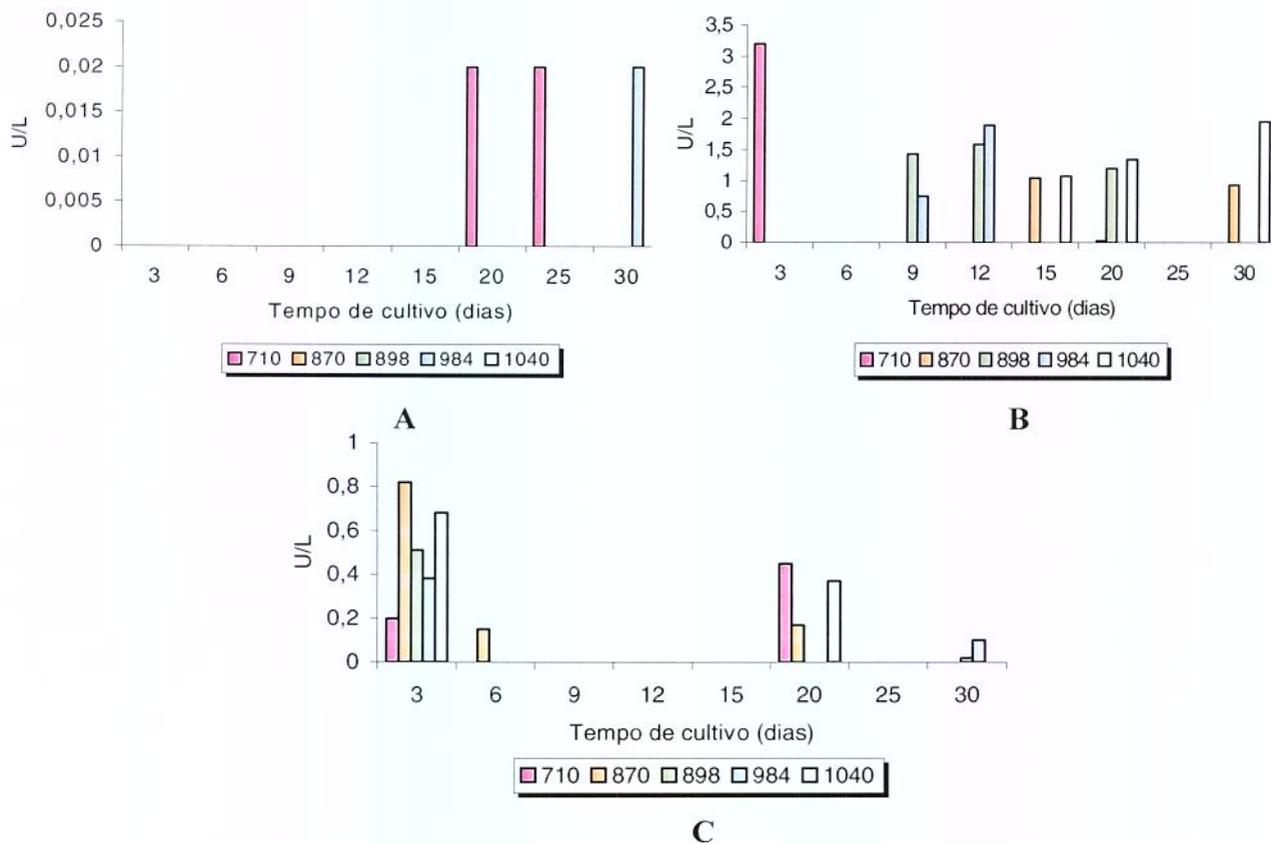
Foram utilizados quantidades de inóculo selecionados no estudo anterior e a degradação, atividades das enzimas e biosurfactantes foram determinadas.

#### 5.4.1. Adição do naftaleno

##### 5.4.1.1. Com o inóculo

As linhagens foram crescidas neste HAP durante 30 dias e a adição deste composto ocorreu juntamente com o inóculo.

#### ❖ Atividade ligninolítica

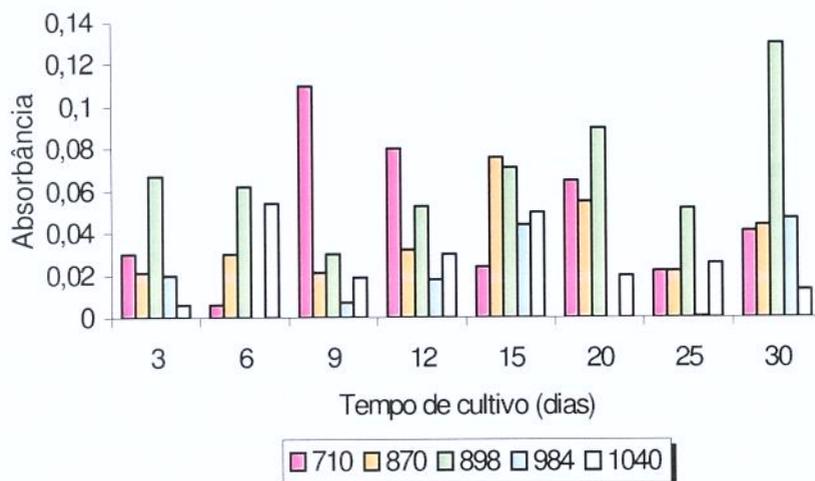


**FIGURA 23:** Atividades ligninolíticas após crescimento das linhagens em naftaleno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. Lacase.

Foi observado que nesta condição, as linhagens não apresentaram atividade de LiP (Fig. 23 A), exceto a linhagem *Acremonium* sp (710) que apresentou esta atividade após 20 e 25 dias de cultivo e a linhagem *Verticillium* sp (1040) que apresentou LiP após 30 dias de cultivo. A produção de atividade de MnP (Fig 23 B) foi detectada em todos os dias analisados, exceto no 6° e 25° dia de cultivo. No 3° dia de cultivo observou-se que somente a linhagem *Acremonium* sp (710) produziu esta atividade. No 9° e 12° dia de cultivo somente as linhagens *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) produziram MnP. No 15° e 30° dia foi detectado MnP no sobrenadante das linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Verticillium* sp (1040). Sendo que no 20° dia as linhagens *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040) produziram esta atividade. Os maiores valores de atividade de lacase (Fig 23 C) foram detectados após 3 dias de cultivo para todas as linhagens, exceto para a linhagem *Acremonium* sp (710) que apresentou um maior valor de atividade com 20 dias de cultivo.

De uma maneira geral observou-se que as linhagens produziram atividade ligninolítica a qual variou com a linhagem e com o dia de cultivo.

❖ **Atividade de biosurfactante: aumento de absorbância (emulsão óleo em água) e formação de halo (emulsão água em óleo)**

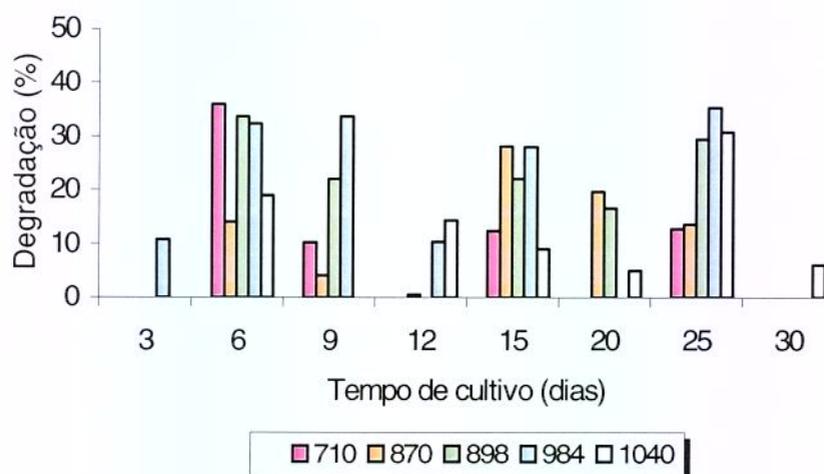


**FIGURA 24:** Atividade de biosurfactante produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono, adicionado junto com o inóculo.

Foi observado que todas as linhagens apresentaram atividade de biosurfactante (Fig 24) em todos os dias analisados, exceto a linhagem *Aspergillus* sp (984) que não apresentou esta atividade com 6 e 20 dias de cultivo. As linhagens não apresentaram a formação de halo, exceto a linhagem *Aspergillus* sp (984) a qual produziu halo de 0,4 cm com 20 dias de cultivo.

Quanto à produção de citocromo P-450, as cinco linhagens não apresentaram esta proteína em nenhum dos dias analisados.

#### ❖ Degradação de naftaleno



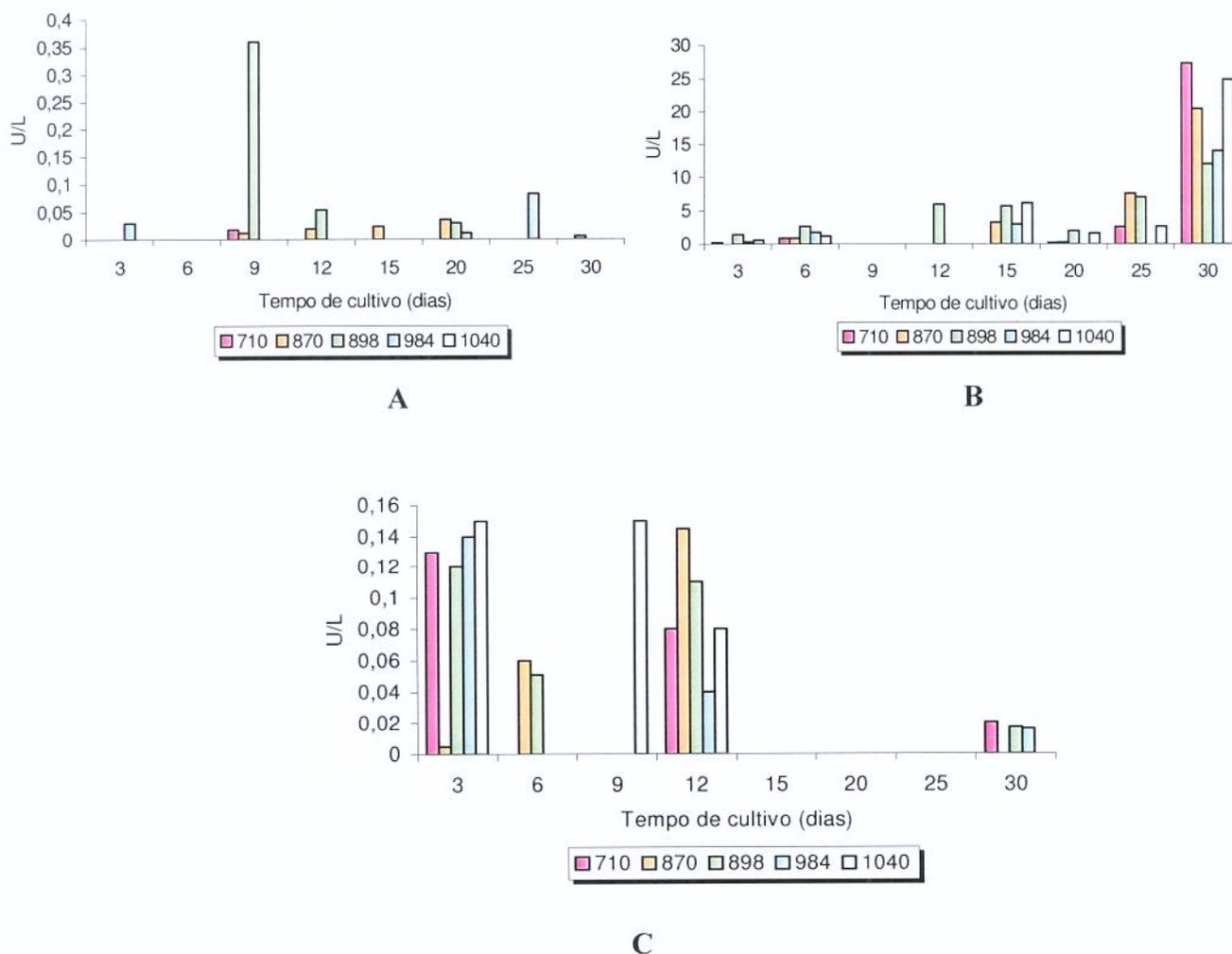
**FIGURA 25:** Degradação de naftaleno produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno, adicionado junto com o inóculo.

Observou-se (Fig 25), que após a extração e análise por CLAE as linhagens apresentaram diferentes porcentagens de degradação do composto utilizado. Os melhores dias de degradação foram no 6º, 15º e 25º dia de cultivo. Sendo que a melhor degradação foi realizada pela linhagem *Acremonium* sp (710) no 6º dia de cultivo (35,9%).

### 5.4.1.2. No 3º dia de crescimento

As linhagens foram crescidas neste HAP, sendo que a adição deste substrato ocorreu no 3º dia de cultivo, e cultivou-se por um período de 30 dias.

#### ❖ Atividade ligninolítica



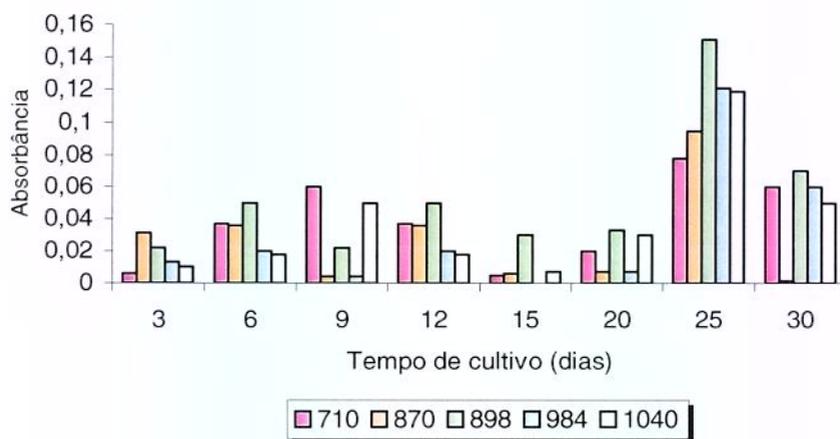
**FIGURA 26:** Atividades ligninolíticas após crescimento das linhagens em naftaleno como fonte de carbono, adicionado no 3º dia de cultivo. A. LiP; B. MnP; C. Lacase.

Observou-se que nesta condição, as linhagens apresentaram atividade de LiP (Fig 26A), excetuando-se a linhagem *Verticillium* sp (1040) que não produziu esta atividade em nenhum dos

dias analisados. A linhagem *Fusarium* sp (898) produziu a maior quantidade de LiP detectada (0,036 U/L), no 9º dia de cultivo. Observou-se que as linhagens produziram MnP (Fig 26B) nos dias analisados, excetuando-se no 9º dia de cultivo. No 12º dia de cultivo somente a linhagem *Fusarium* sp (898) produziu esta enzima. Sendo que o melhor dia para produção de MnP foi no 30º dia de cultivo. As linhagens aqui estudadas produziram lacase (Fig 26C) no 3º e 12º dia de cultivo, no 6º dia somente as linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Fusarium* sp (898) produziram esta enzima, no 9º dia, lacase foi produzida somente pela linhagem *Verticillium* sp (1040) e no 30º dia detectou-se esta atividade nos sobrenadantes das linhagens *Acremonium* sp (710), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984). Nos demais dias de análise esta enzima não foi detectada.

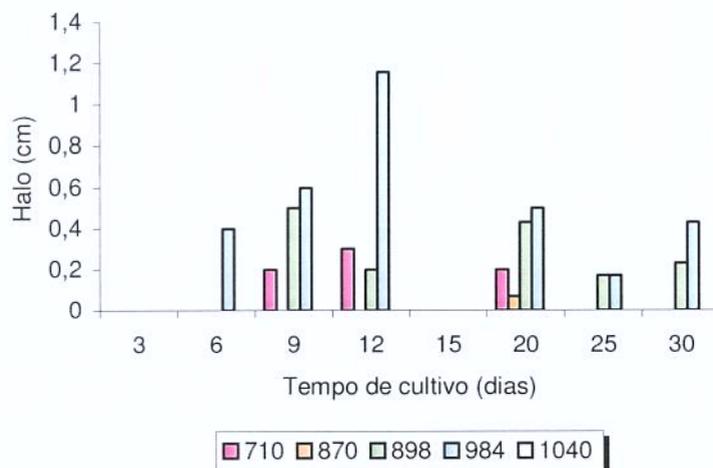
De maneira geral as linhagens apresentaram atividades ligninolíticas, e quando comparadas com a adição de naftaleno juntamente com o inóculo, os valores de atividade foram maiores para as 3 enzimas estudadas.

#### ❖ Atividade de biosurfactante



**FIGURA 27:** Atividade de biosurfactante, aumento da absorvância produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono, adicionado no 3º dia de cultivo.

A atividade de biosurfactante (Fig 27) foi detectada em todos os dias analisados. O melhor dia para a produção desta foi no 25º dia de cultivo, onde as cinco linhagens apresentaram o maior valor desta atividade.

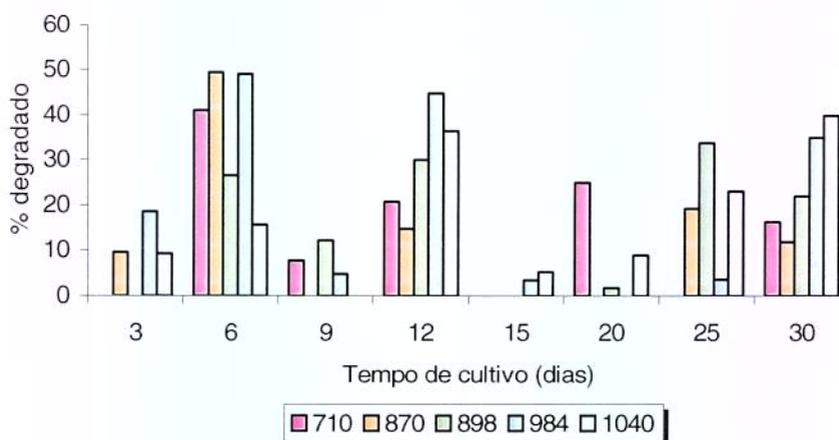


**FIGURA 28:** Atividade de biosurfactante por formação de halo produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono, adicionado no 3º dia de cultivo.

Estas linhagens, nesta condição de cultivo, apresentaram a formação de halo (cm) como visto na Figura 28. Esta produção de halo foi variável e o maior halo detectado foi formado pela linhagem *Aspergillus* sp (984) com 12 dias de cultivo (1,16 cm).

Quanto à produção de citocromo P-450, as cinco linhagens não apresentaram esta proteína em nenhum dos dias analisados.

❖ Degradação



**FIGURA 29:** Degradação de naftaleno, adicionado no 3º dia de cultivo, produzida pelas linhagens.

Observou-se que as linhagens apresentaram diferentes porcentagens de degradação (Fig 29) deste composto nesta condição de cultivo. Todas as linhagens apresentaram degradação deste HAP, sendo que as melhores porcentagens de degradação foram detectadas no 6º e 12º dia de cultivo.

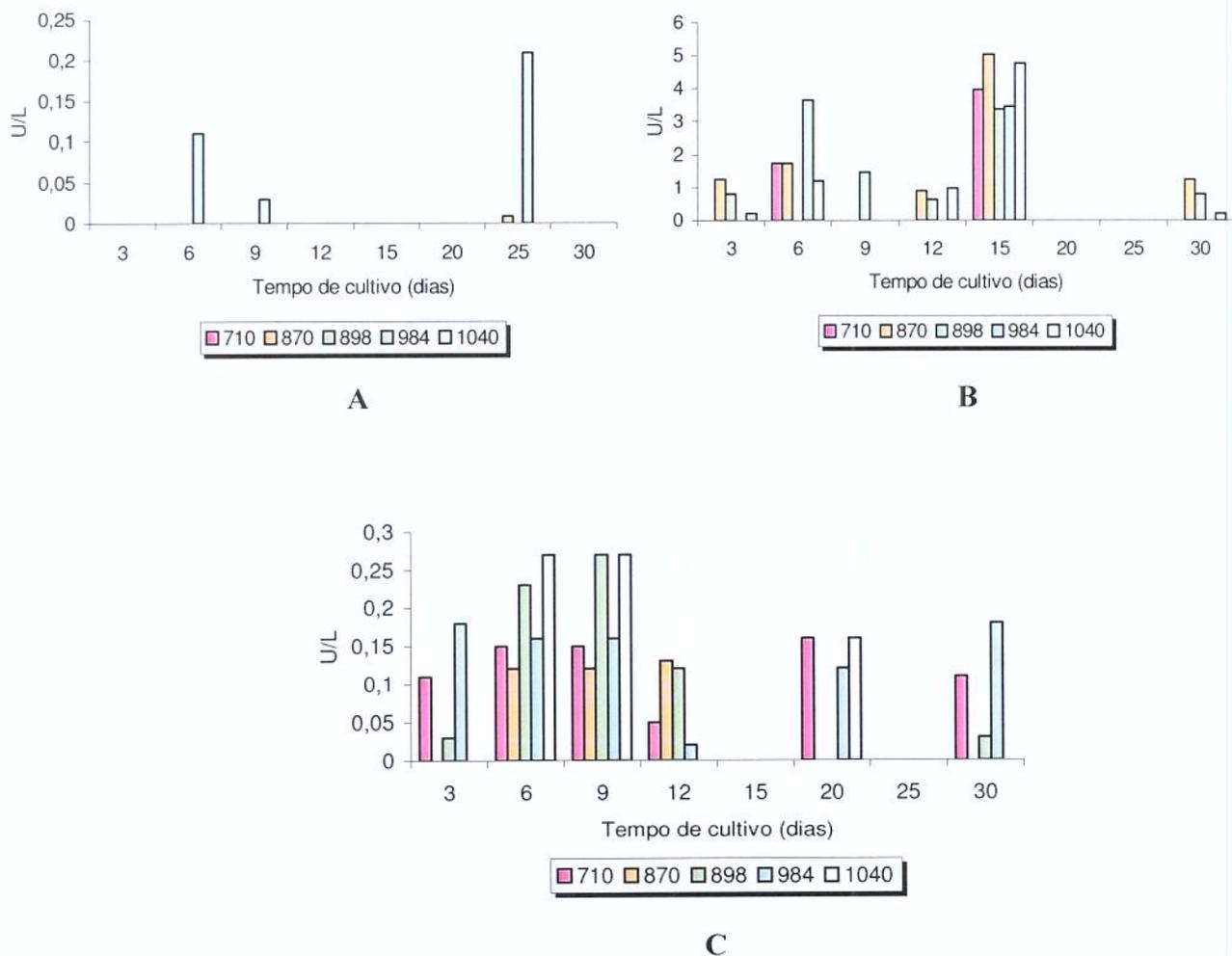
Após estas análises utilizando naftaleno como fonte de carbono, adicionado tanto junto com o inóculo como no 3º dia, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos quando o composto foi adicionado no 3º dia de cultivo.

### 5.4.2. Adição do antraceno

#### 5.4.2.1. Com inóculo

As linhagens foram crescidas neste HAP durante 30 dias e a adição deste ocorreu juntamente com o inóculo.

❖ Atividade ligninolítica



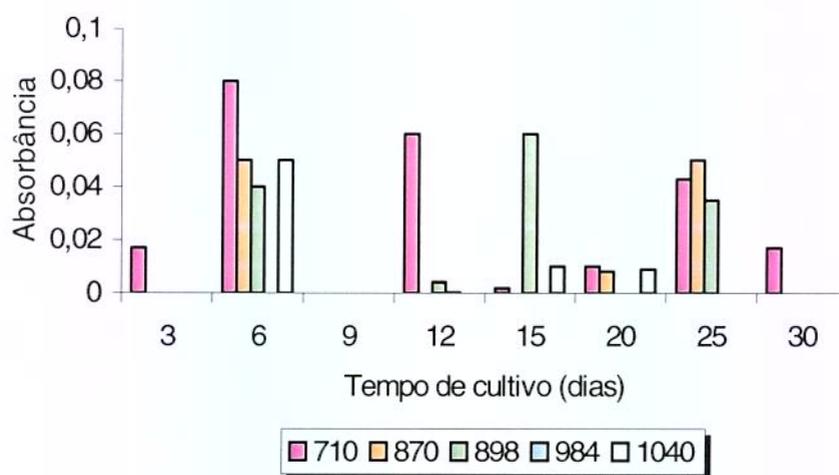
**FIGURA 30:** Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em antraceno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.

A Figura 8 mostra os valores obtidos de atividade de LiP (Fig 30A) onde observou-se que somente a linhagem *Aspergillus* sp (984) produziu esta atividade no 6°, 9° e 25° dia de cultivo e a linhagem *Trichoderma* sp (870) no 25° dia. As demais linhagens não produziram atividade de LiP em nenhum dos dias analisados. A atividade de MnP (Fig 30B) não foi produzida por nenhuma das linhagens nos 20° e 25° dia de cultivo, conforme pode ser verificado. No 15° dia de cultivo todas as linhagens apresentaram esta atividade, e também as maiores concentrações de MnP. De

acordo com a Figura 30C observou-se que nenhuma das 5 linhagens fúngicas produziram lacase no 15º e 25º dia de cultivo, sendo os melhores valores desta enzima produzidos, pelas cinco linhagens fúngicas, no 6º e 9º dia. Verificou-se que a linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou pico máximo de atividade tanto no 6º quanto no 9º dia.

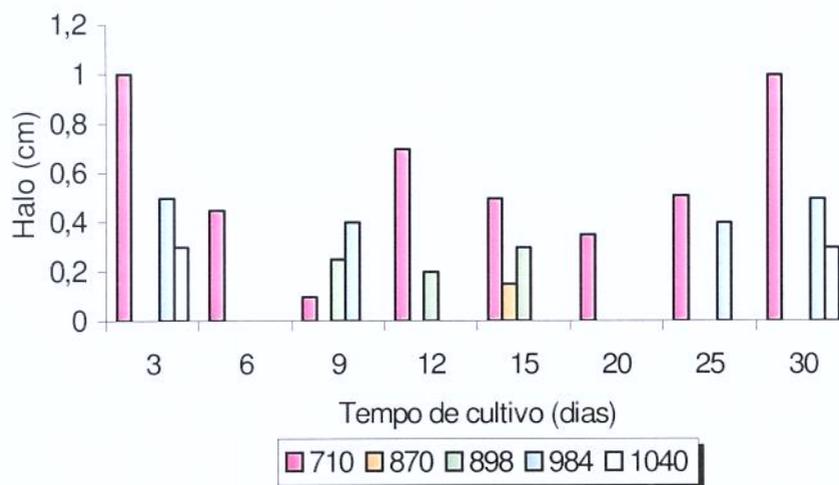
De maneira geral as linhagens apresentaram atividade ligninolítica, sendo que a atividade de LiP foi baixa e a atividade de MnP foi a que apresentou maior valor de atividade.

#### ❖ Atividade de biosurfactante



**FIGURA 31:** Atividade de biosurfactante por aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.

Após a análise da determinação de biosurfactante (Fig. 31), observou-se que a linhagem *Acremonium* sp (710) foi a que produziu esta atividade em todos os dias analisados, exceto no 9º dia. As demais linhagens apresentaram baixa produção deste tipo de biosurfactante.



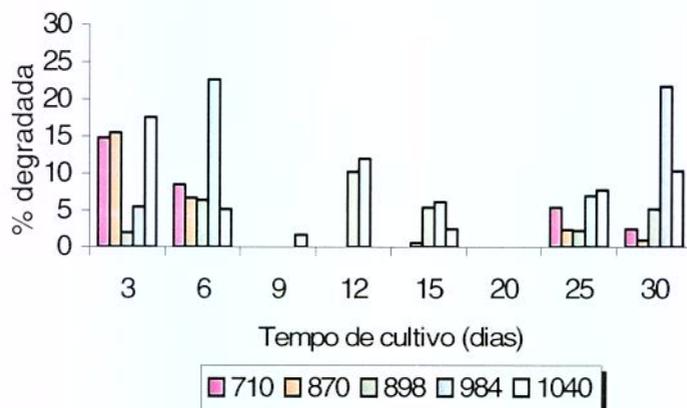
**FIGURA 32:** Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.

Na Figura 32 pode-se verificar que a formação de halo foi variável e a linhagem *Acremonium* sp (710) foi a que apresentou halo em todos os dias analisados.

#### ❖ Proteína citocromo P-450

Após determinação da proteína cit P-450, observou-se que a linhagem *Acremonium* sp (710) produziu esta proteína somente no 30º dia de cultivo, após tratamento com CO (0,007 nmol mg<sup>-1</sup> proteína). Já a linhagem *Trichoderma* sp (870) produziu cit P-450 com 9, 12 e 30 dias (0,02, 0,03 e 0,005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente), também após tratamento com CO. A detecção de cit P-450 no meio de cultivo da linhagem *Fusarium* sp (898) ocorreu no 6º dia (0,006 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO; e no 15º dia detectou-se esta proteína tanto após tratamento com CO como após adição e ditionato (0,01 e 0,014 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente). A linhagem *Aspergillus* sp (984) produziu cit P-450 no 12º dia (0,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato e no 15º e 25º dia (0,01 e 0,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO. A linhagem *Verticillium* sp (1040) produziu citocromo no 15º e 20º dia de cultivo (0,005 e 0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO.

❖ Degradação



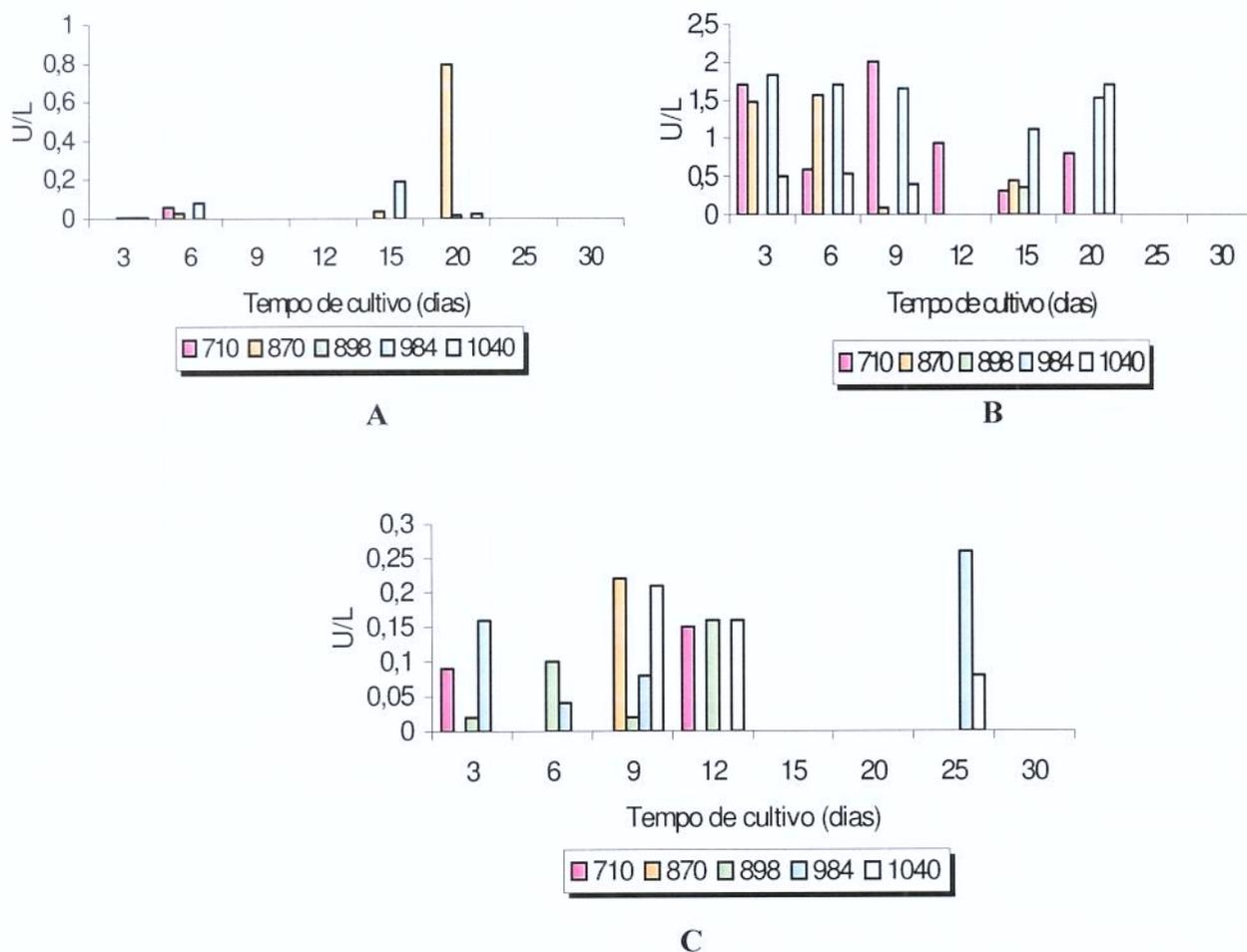
**FIGURA 33:** Degradação de antraceno, adicionado junto com o inóculo, produzida pelas linhagens fúngicas.

Após estudo da degradação de antraceno (Fig. 33) por CLAE, observou-se que os melhores resultados de degradação foram obtidos no 3º dia, exceto para as linhagens *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) as quais apresentaram melhores resultados após 12 e 6 dias de cultivo, respectivamente

**5.4.2.2. No 3º dia de crescimento**

As linhagens foram crescidas neste HAP, sendo que a adição deste substrato ocorreu no 3º dia de cultivo, e incubou-se por um período de 30 dias.

❖ Atividade ligninolítica



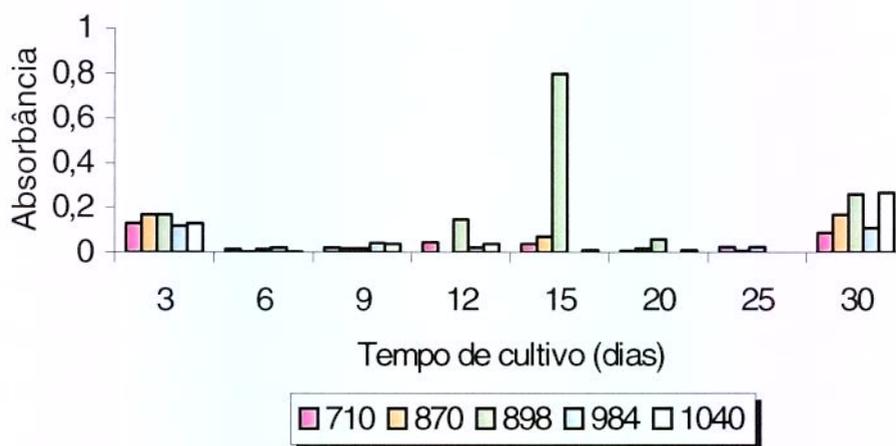
**FIGURA 34:** Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em antraceno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.

Conforme a Figura 34, as linhagens *Fusarium* sp (898), *Aspergillus* sp (984) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram atividade de LiP (Fig 34A) com 3 dias de cultivo, enquanto que no 6º dia somente as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984) apresentaram esta atividade. Com 15 dias de cultivo as linhagens que apresentaram atividade de LiP foram *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984) e no 20º dia, as linhagens *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040). No 9º, 12º, 25º e 30º não se detectou a produção desta atividade pelas linhagens aqui estudada. De uma forma geral poucas linhagens produziram LiP nos dias analisados. A produção de MnP é mostrada na Fig 34B.

Observou-se que as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Aspergillus* sp (984) produziram MnP em praticamente todos os dias analisados. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou MnP no 3º, 6º, 9º e 15º dia de cultivo, a linhagem *Fusarium* sp (898) apresentou MnP somente no 15º dia e a linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou MnP no 3º, 6º, 9º e 20º dia de cultivo. Esta enzima não foi detectada nos dias 25 e 30 de crescimento pelas 5 linhagens aqui estudadas. A atividade de lacase é mostrada na Fig 34C, observou-se que a linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou atividade de lacase no 3º e 12º dia, a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou esta atividade somente com 9 dias. A linhagem *Fusarium* sp (898) apresentou atividade de lacase na maioria dos dias analisados, excetuando-se no 15º, 20º, 25º e 30º dia, a linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou lacase no 3º, 6º, 9º, e 25º dia e no sobrenadante da linhagem *Verticillium* sp (1040) a atividade de lacase foi detectada com 9, 12 e 25 dias de cultivo. A produção de lacase não foi detectada com 15, 20 e 30 dias.

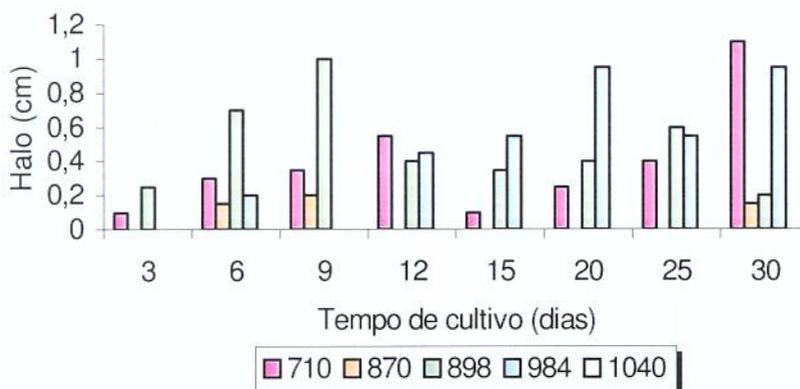
De maneira geral as atividades aqui estudadas foram detectadas nos sobrenadantes das linhagens em maior valor quando comparada com a adição do composto junto com o inóculo, exceto para MnP que produziu maior valor de atividade quando o substrato foi adicionado junto com o inóculo.

#### ❖ Atividade de biosurfactante



**FIGURA 35:** Atividade de biosurfactante por aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono.

Quanto a produção de biosurfactante (Fig.35), observou-se que todas as linhagens em todos os dias analisados produziram este composto em baixa quantidade, exceto a linhagem *Fusarium* sp (898) que produziu alta quantidade de biosurfactante com 15 dias de cultivo.



**FIGURA 36:** Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono.

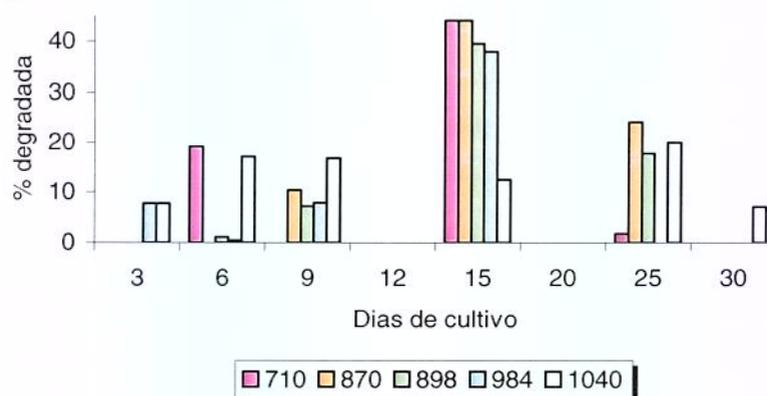
Quanto a formação de halo (Fig.36) verificou-se que as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Fusarium* sp (898) formaram halo em todos os dias analisados, a linhagem *Verticillium* sp (1040) não apresentou formação de halo em nenhum dos dias, enquanto que a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou halo no 6º, 9º e 30º dia e a linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou halo no 6º, 12º, 15º, 20º, 25º e 30º dia de cultivo.

#### ❖ Proteína citocromo P-450

Após determinação de cit P-450, quando o composto foi adicionado no 3º dia, observou-se que a linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou esta atividade no 25º dia (0,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou atividade desta proteína no 20º dia de cultivo, tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato (0,008 e 0,01 nmol/mg proteína, respectivamente). A produção de cit P-450 foi detectada no 9º e 15º dia de cultivo ( 0,001 e 0,005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína), após crescimento da linhagem *Fusarium* sp (898) utilizando antraceno como fonte de carbono, sendo que no 9º dia após adição de ditionato e no 15º dia após tratamento com CO. A linhagem

*Aspergillus* sp (984) apresentou cit P-450 no 9° e 15° dia (0,01 e 0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente) após tratamento com CO. A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou cit P-450 no 3° dia (0,004 e 0,0005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato e também no 30° dia (0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO.

#### ❖ Degradação



**FIGURA 37:** Degradação de antraceno, adicionado no 3° dia de cultivo, produzida pelas linhagens fúngicas.

Como pode ser observado na Figura 37, no 12° e 20° dia de cultivo as linhagens não apresentaram degradação deste composto. A melhor porcentagem de degradação foi obtida no 15° dia para todas as linhagens, exceto a linhagem *Verticillium* sp (1040) que apresentou melhor degradação após 25 dias de crescimento.

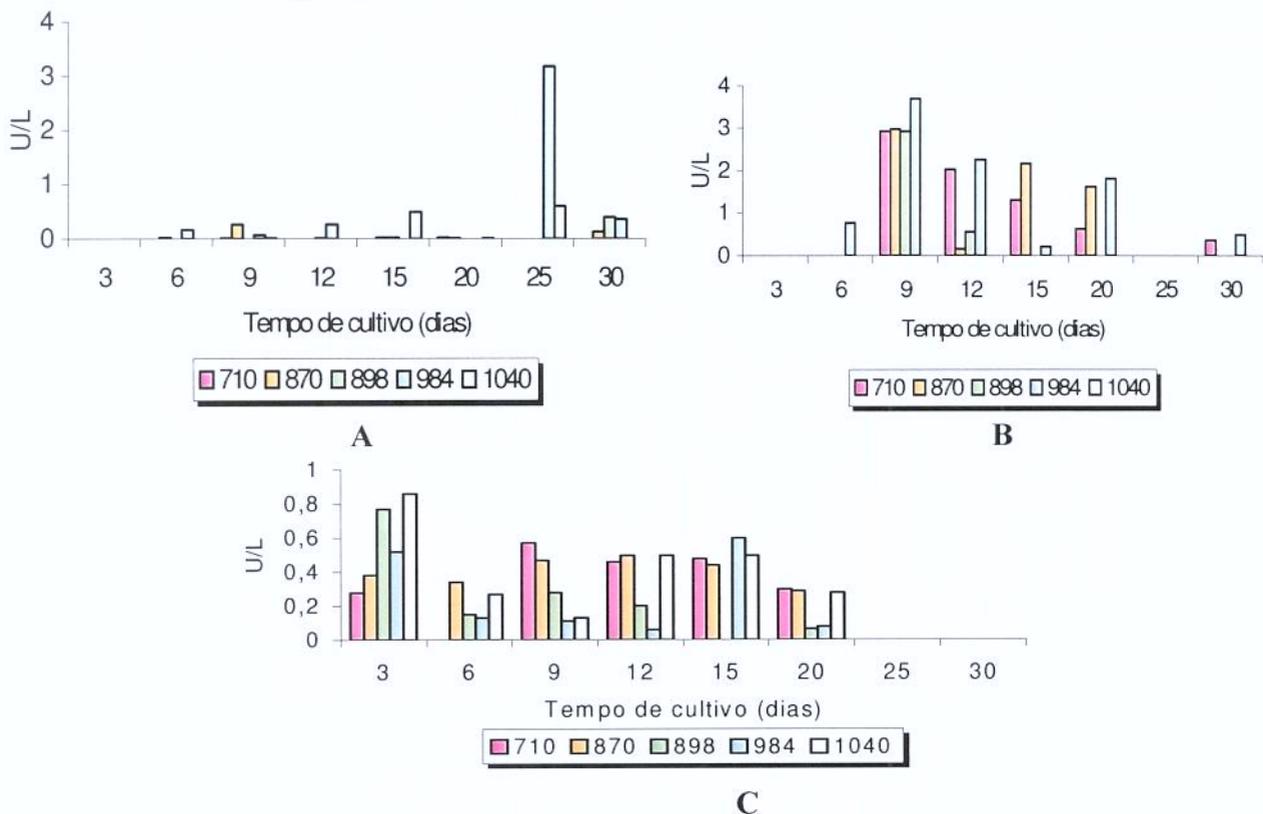
Após estas análises utilizando antraceno como fonte de carbono, adicionado tanto junto com o inóculo como no 3° dia, observa-se que os melhores resultados de atividade enzimática e degradação foi quando se adicionou o composto no 3° dia de crescimento.

### 5.4.3. Adição de Pireno

#### 5.4.3.1. Com inóculo

As linhagens foram crescidas neste HAP, adicionado juntamente com o inóculo e incubado por um período de 30 dias.

❖ Atividades ligninolíticas

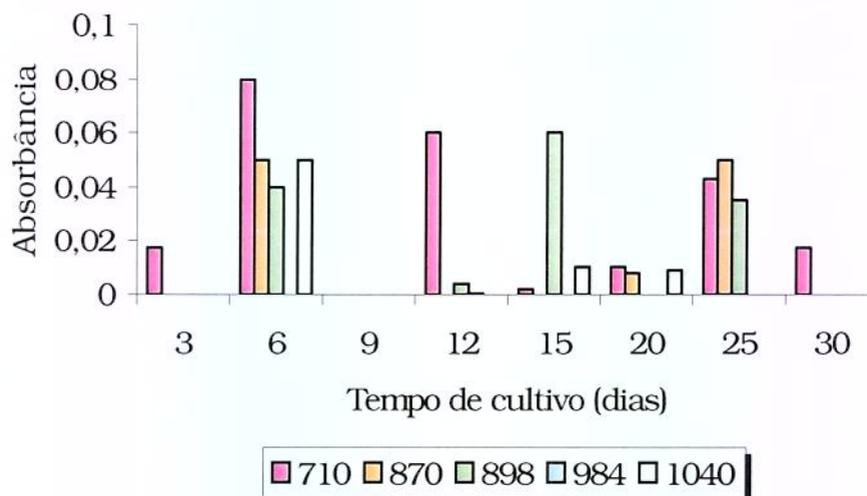


**FIGURA 38:** Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.

Conforme é mostrado na Figura 38A, a atividade de LiP foi detectada em todos os dias analisados, sendo que a maior produção desta enzima foi obtido pela linhagem *Aspergillus* sp (984) com 25 dias de cultivo. No 3º dia de cultivo a linhagem *Aspergillus* sp (984) produziu LiP mas o valor detectado foi muito baixo (0,001 U/L). De acordo com a Figura 38B verificou-se que as linhagens não apresentaram atividade de MnP no 3º e 25º dia de cultivo. A linhagem *Verticillium* sp (1040) não apresentou esta atividade em nenhum dos dias analisados, enquanto que as demais linhagens, apresentaram maior produção de MnP no 9º dia de crescimento. As linhagens não apresentaram atividade de lacase (Fig 38C) no 25º e 30º dia de cultivo. O maior valor de lacase para as cinco linhagens foi obtida no 3º dia de crescimento.

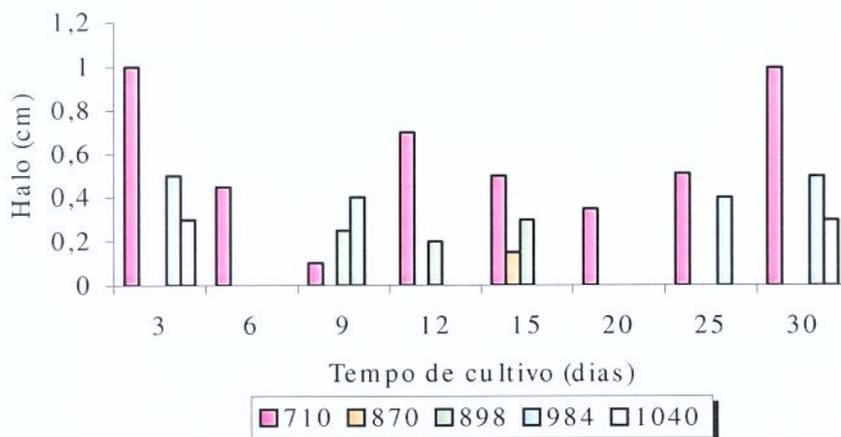
De uma maneira geral observou-se que as linhagens apresentaram atividades ligninolíticas, durante todo o experimento, principalmente da enzima lacase a qual foi detectada em todos os sobrenadantes das linhagens, no início do experimento.

❖ **Atividade de biosurfactante**



**FIGURA 39:** Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.

Após a análise da determinação de biosurfactante (Fig 39), observou-se que a linhagem *Acremonium* sp (710) produziu este tipo de biosurfactante em todos os dias analisados, exceto no 9º dia. As demais linhagens apresentaram baixa produção de biosurfactante. Os maiores valores de biosurfactante foram detectados na 6º dia de experimento.



**FIGURA 40:** Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.

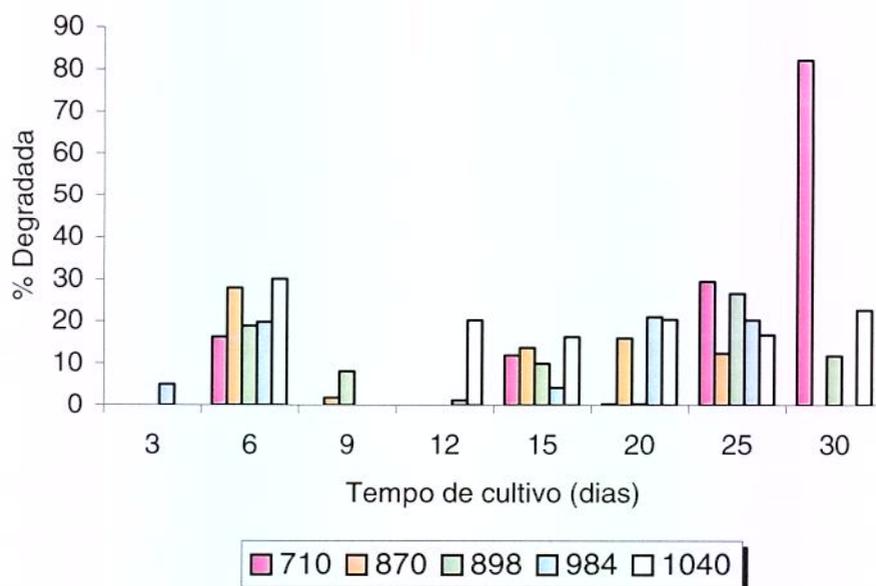
Na Figura 40 são apresentados os resultados obtidos da atividade de biosurfactante pela formação de halo. Como pode ser observado houve a formação de emulsão água em óleo em todos os dias analisados, porém esta produção foi variável, sendo que os maiores valores de halo foram obtidos no 3º e 30º dia de experimento.

#### ❖ Proteína citocromo P-450

Após determinação da proteína cit P-450, a linhagem *Acremonium* sp (710) produziu esta proteína no 9º dia e cultivo ( $0,003 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) após tratamento com CO e no 15º dia ( $0,004 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) após adição de ditionato. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou atividade cit P-450 somente no 12º dia de cultivo ( $0,002 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) após tratamento com CO. A proteína P-450 foi detectada somente no 20º dia ( $0,012 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) após tratamento com CO, para a linhagem *Fusarium* sp (898). A linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou cit P-450 nos dias 12, 15 e 20 ( $0,0004$ ,  $0,003$  e  $0,006 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína, respectivamente) após tratamento com CO. A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou atividade de citocromo no 3º dia ( $0,02$  e  $0,03 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) tanto após tratamento com CO

como após adição de ditionato, no 6º dia (0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 12º e 20º dia (0,002 e 0,07 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato.

#### ❖ Degradação



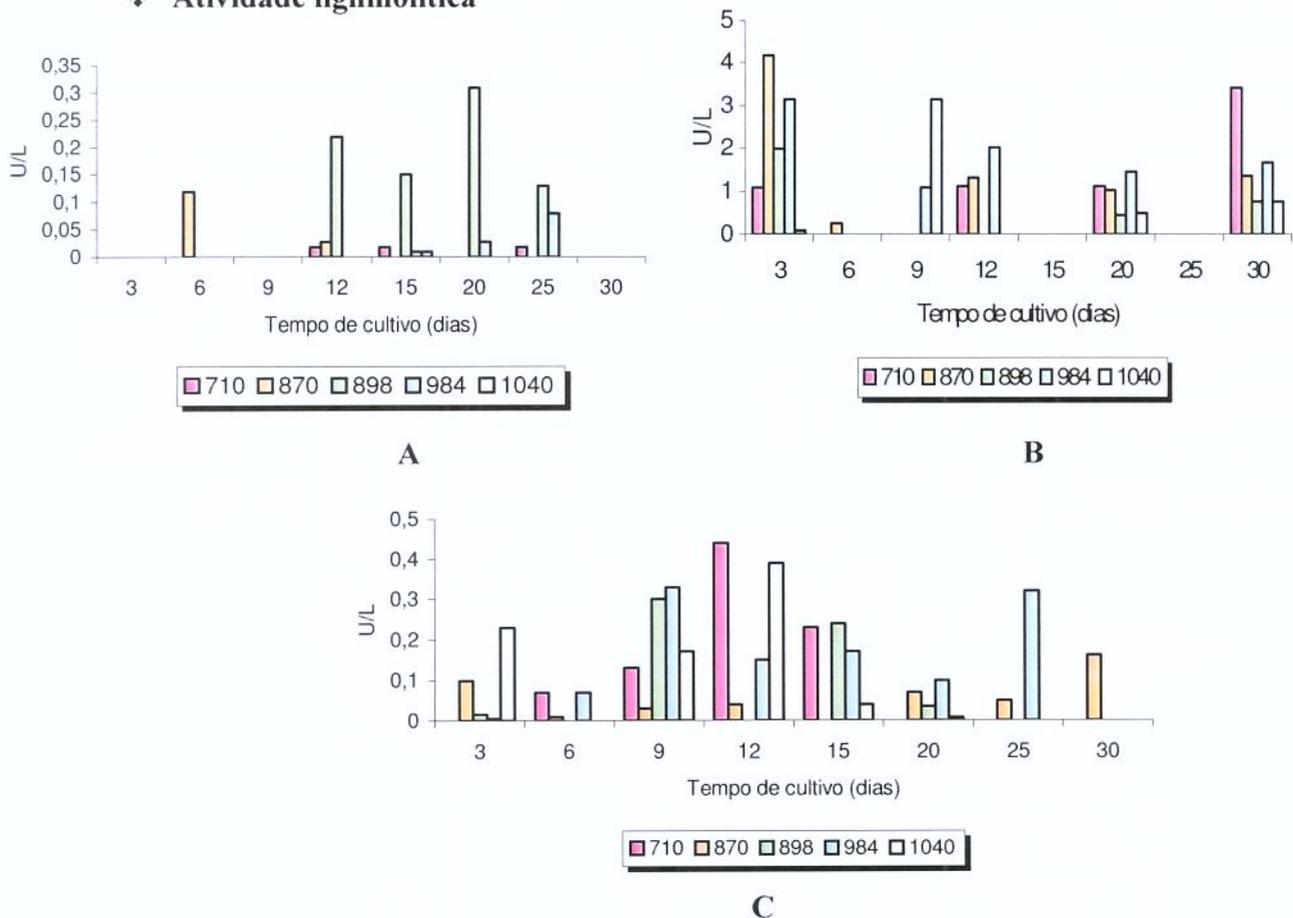
**FIGURA 41:** Degradação de pireno, adicionado junto com o inóculo, produzida pelas linhagens fúngicas.

Observou-se na Figura 41 que todas as linhagens foram capazes de degradar pireno como única fonte de carbono. Sendo os melhores resultados de degradação obtidos no 6º e 25º dia, no qual todas as linhagens degradaram pireno em maior quantidade, excetuando-se a linhagem *Acremonium* sp (710) que produziu uma grande degradação deste composto com 30 dias de cultivo.

#### 5.4.3.2. No 3º dia de crescimento

As linhagens foram crescidas neste HAP, sendo que a adição deste substrato ocorreu no 3º dia de cultivo, e cultivou-se por um período de 30 dias.

❖ Atividade ligninolítica



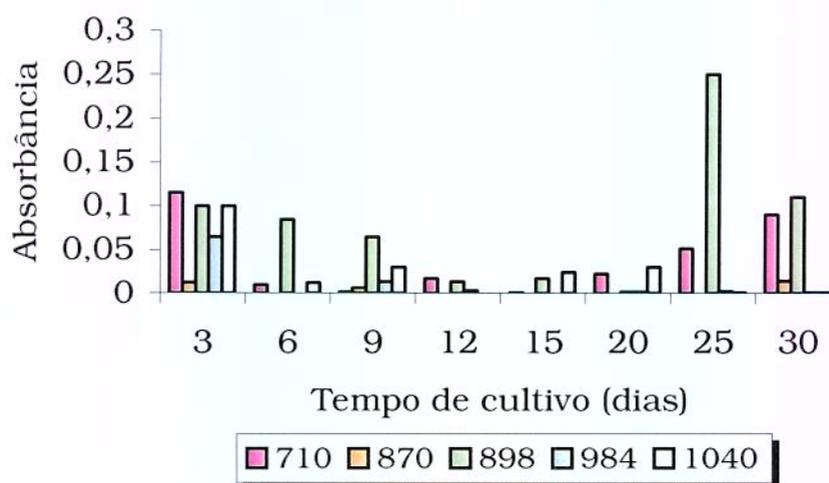
**FIGURA 42:** Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em pireno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.

A atividade de LiP é mostrada na Figura 42A. Como pode se verificar não foi detectada atividade de LiP no 3º, 9º e 30º dia de cultivo. No 6º dia somente a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou esta atividade. As linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Fusarium* sp (898) apresentaram LiP com 12 dias de cultivo. No 15º dia todas as linhagens apresentaram atividade de LiP, exceto a linhagem *Trichoderma* sp (870). No 20º dia esta atividade foi detectada no sobrenadante das linhagens *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984). Sendo que no 25º dia a atividade desta enzima foi produzida pelas linhagens *Acremonium* sp (710), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984). De acordo com a Figura 42B, a atividade de MnP não foi detectada no 15º e 25º dia de cultivo. Já no 3º, 20º e 30º dia de cultivo todas as

linhagens apresentaram atividade de manganês peroxidase. Com 6 dias de cultivo somente a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou MnP. No 9º dia esta atividade foi detectada no sobrenadante das linhagens *Aspergillus* sp (984) e *Verticillium* sp (1040). Somente as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984) apresentaram esta atividade no 12º dia de cultivo. Como se pode observar na Figura 42C a atividade de lacase foi detectada em todos os dias analisados, sendo que no 9º dia de cultivo todas as linhagens apresentaram atividade de lacase. A maior produção desta enzima foi detectada nos sobrenadantes da maioria das linhagens entre o 9º e 15º dia de cultivo.

De uma maneira geral as atividades ligninolíticas apresentaram valores médios semelhantes, tanto para a adição do HAP junto com o inóculo como no 3º dia de cultivo.

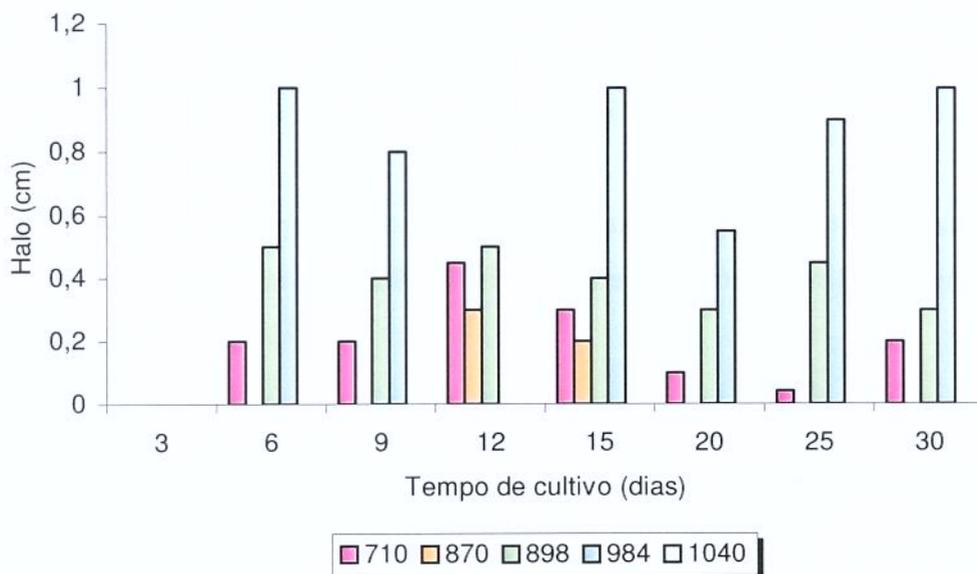
#### ❖ Atividade de biosurfactante



**FIGURA 43:** Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono.

Conforme observado na Figura 43, verificou-se que as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Fusarium* sp (898) apresentaram a formação de biosurfactante em todos os dias analisados. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou a formação deste composto somente no 3º, 9º e 30º dia de cultivo. Este composto foi detectado no sobrenadante da linhagem *Aspergillus* sp no 3º, 9º,

12°, 20°, 25° e 30° dia. A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou atividade de biosurfactante em todos os dias analisados, exceto no 12° dia de crescimento.



**FIGURA 44:** Atividade de biosurfactante por formação de halo, (emulsão água em óleo) produzida pelas linhagens após crescimento em pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, como fonte de carbono.

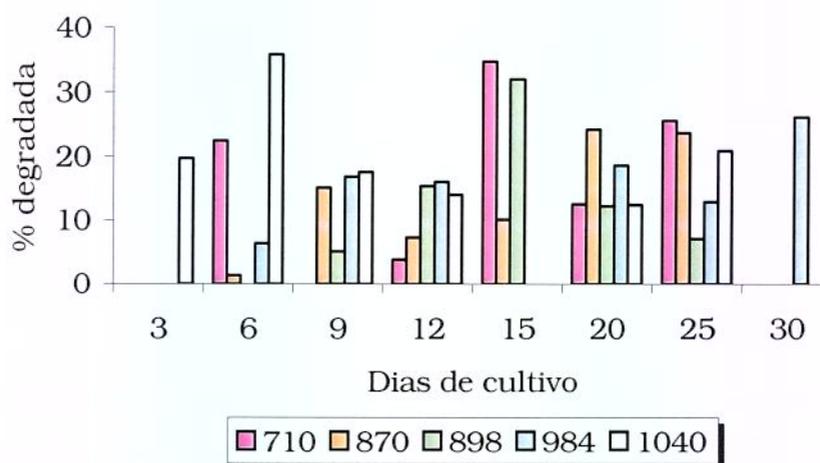
Já quanto a formação de halo (Fig 44), observa-se que no 3° dia nenhuma das linhagens apresentaram halo. As linhagens *Acremonium* sp (710), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) produziram halo em todos os dias exceto no 12° para a linhagem *Aspergillus* sp (984). A linhagem *Trichoderma* sp (870) produziu halo somente no 12° e 15° dia de crescimento. A linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou os maiores valores de atividade de biosurfactante em todos os dias amostrados.

#### ❖ Proteína citocromo P-450

Após análise da produção de citocromo P-450 observou-se que a linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou esta atividade no 9° dia (0,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 25° dia (0,01 e 0,008 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após adição de

ditionato. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou cit P-450 nos dias 12 e 15 (0,013 e 0,007 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente) após tratamento com CO. Esta enzima foi detectada no micélio da linhagem *Fusarium* sp (898) no 25° dia (0,001 e 0,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após a adição de ditionato. A linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou atividade de cit P-450 no 3° dia (0,01 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato, no 15° dia (0,014 e 0,002 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato, e no 30° dia (0,004 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO. A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou cit P-450 no 20° dia (0,01 e 0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato, e no 25° dia (0,008 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato.

#### ❖ Degradação



**FIGURA 45:** Degradação de pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, produzida pelas linhagens fúngicas.

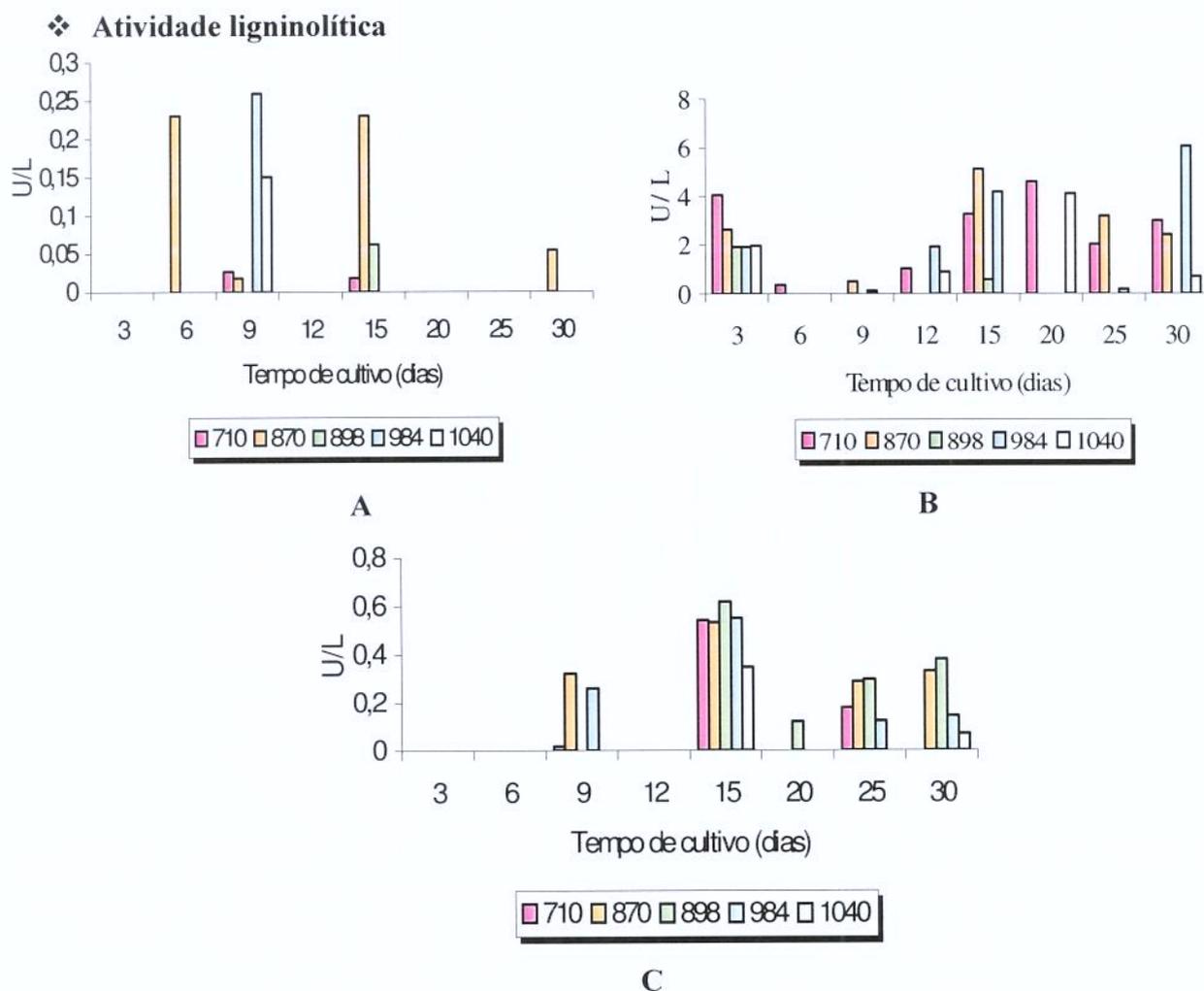
Conforme Figura 45, a porcentagem de degradação de pireno variou de linhagem para linhagem, e de dia para dia. Para as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Fusarium* sp (898), a melhor taxa de degradação foi obtida no 15° dia. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou melhor degradação após 20 dias e para a linhagem *Aspergillus* sp (984) o melhor dia foi o 30° enquanto a linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou melhor porcentagem de degradação com 6 dias de cultivo.

Após estas análises utilizando pireno como fonte de carbono, adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia, observou-se que os resultados de atividade enzimática e degradação foram similares.

#### 5.4.4. Adição de Benzo[a]pireno

##### 5.4.4.1. Com inóculo

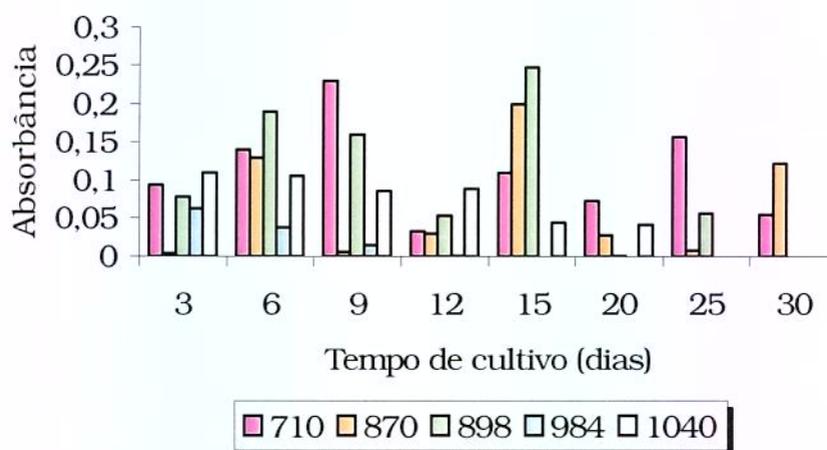
As linhagens foram crescidas neste HAP e a fonte de carbono foi adicionada juntamente com o inóculo e incubou-se por um período de 30 dias.



**FIGURA 46:** Atividades ligninolíticas produzida pelas linhagens crescidas em benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. laccase.

De acordo com a Figura 46A, a atividade de LiP não foi detectada no 3º, 12º, 20º e 25º dia de cultivo. No 6º e no 30º dia somente a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou LiP. Com 9 dias de cultivo, as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870), *Aspergillus* sp (984) e *Verticillium* sp (1040) produziram LiP, sendo que no 15º dia as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Fusarium* sp (898) foram as únicas a produzirem esta atividade. A atividade de MnP (Fig 46B) foi produzida em níveis variados pelas linhagens sendo que no 3º dia todas as linhagens produziram esta enzima. No 6º e 9º dia detectou-se a menor produção de MnP, sendo que no 6º dia somente a linhagem *Acremonium* sp (710) a produziu e no 9º a atividade de MnP foi produzida pelas linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984). Conforme observado na Figura 46C as linhagens não produziram atividade de lacase no 3º, 6º e 12º dia de crescimento. No 15º dia todas as linhagens estudadas apresentaram as maiores produções de lacase, sendo o pico máximo obtido com a linhagem *Fusarium* sp (898) no 15º dia de crescimento.

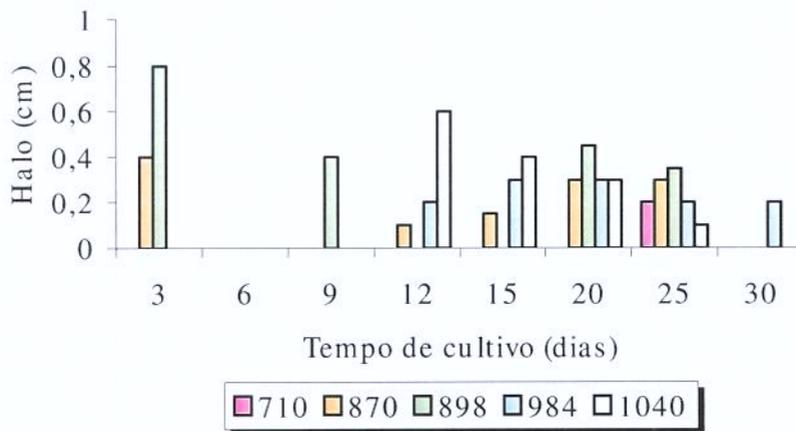
#### ❖ Atividade de biosurfactante



**FIGURA 47:** Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.

A produção de biosurfactante (Fig. 47) foi detectada no sobrenadante das linhagens *Acremonium* sp (710) e *Trichoderma* sp (870) em todos os dias analisados. A linhagem *Fusarium*

sp (898) não produziu este composto somente no 30° dia, enquanto a linhagem *Aspergillus* sp (984) não apresentou a formação deste composto no 20°, 25° e 30° dia. No sobrenadante da linhagem *Verticillium* sp (1040) não foi detectado biosurfactante no 25° e 30° dia de cultivo.



**FIGURA 48:** Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, como fonte de carbono.

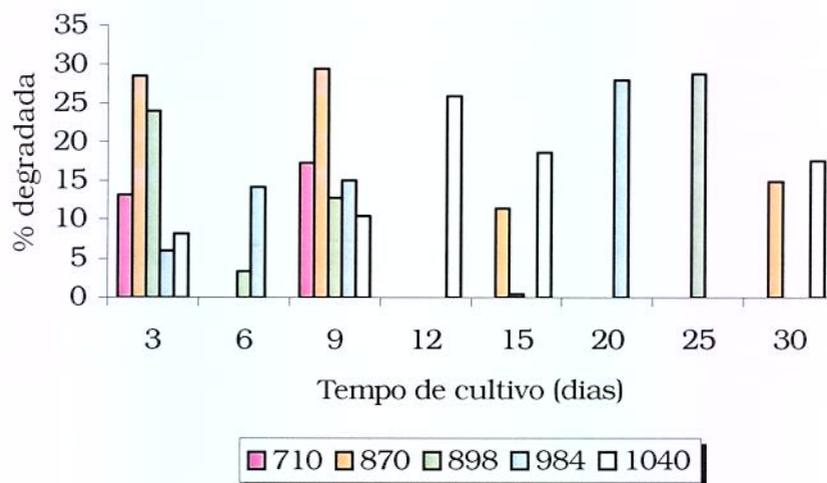
Quanto à formação de halo (Fig 48) produzida pelas linhagens, observou-se que o maior valor de atividade foi produzido no 3° dia de cultivo pela linhagem *Fusarium* sp (898). No 6° dia nenhuma das linhagens produziu este tipo de biosurfactante. No 25° dia todas as linhagens formaram halo.

#### ❖ Proteína citocromo P-450

Comparando os resultados obtidos da produção de cit P-450 pelas linhagens cultivadas em benzo[a]pireno, com os resultados obtidos anteriormente onde as linhagens foram crescidas nos demais HAPs, verificou-se que a produção de cit P-450 apresentou a maior freqüência, porém baixos valores. No 20° dia de cultivo somente a linhagem *Acremonium* sp (710) não produziu atividade de citocromo após ambos os tratamentos. No 25° dia não houve produção de cit P-450, para todas as linhagens estudadas. A linhagem *Acremonium* sp (710) produziu cit P-450 no 3° dia de cultivo ( $0,003 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) após adição de ditionato e no 6° e 9° dia ( $0,008$  e  $0,002 \text{ nmol mg}^{-1}$  proteína) após tratamento com CO. A produção de cit P-450 pela

linhagem *Trichoderma* sp (870) foi detectada no 3º dia (0,002 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato, no 15º dia (0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 20º dia (0,005 e 0,006 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato. A linhagem *Fusarium* sp (898) produziu cit P-450 no 20º (0,013 e 0,005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) e no 30º (0,006 e 0,004 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) dia de cultivo, tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato. A linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou esta proteína no 9º dia (0,008 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 20º dia (0,004 e 0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato. A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou cit P-450 no 9º dia (0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) e no 15º dia (0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato, no 12º dia (0,005 e 0,005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e adição de ditionato e no 20º dia (0,0003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO.

#### ❖ Degradação

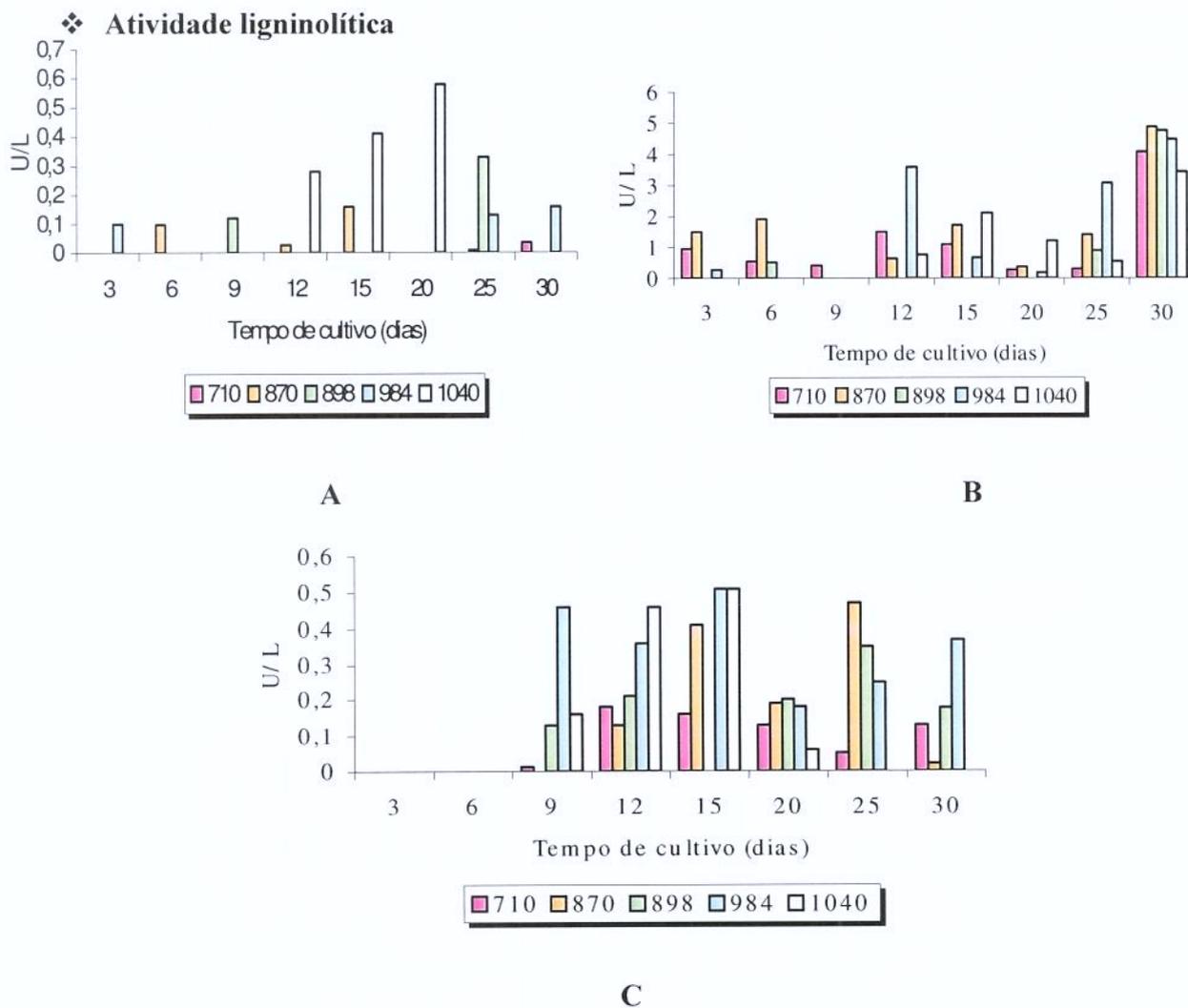


**FIGURA 49:** Degradação de benzo[a]pireno, adicionado junto com o inóculo, produzida pelas linhagens fúngicas.

De acordo com a Figura 49 pode-se observar que todas as linhagens foram capazes de degradar benzo[a]pireno. A melhor taxa de degradação foi obtida no 3º dia de cultivo para as linhagens *Acremonium* sp (870) e *Trichoderma* sp (870), no 25º dia para a linhagem *Fusarium* sp (898), no 20º dia para a linhagem *Aspergillus* sp e com 12 dias de cultivo para a linhagem *Verticillium* sp (1040).

#### 5.4.4.2. No 3º dia de crescimento

As linhagens foram crescidas neste HAP, sendo que a adição ocorreu no 3º dia de cultivo, e incubou-se por um período de 30 dias.

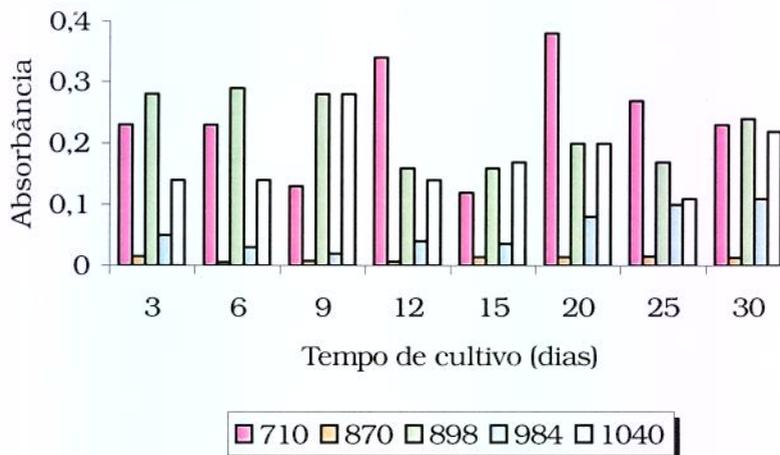


**FIGURA 50:** Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens crescidas em benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia, como fonte de carbono. A. LiP; B. MnP; C. lacase.

De acordo com a Figura 50A, pode-se observar que a atividade de LiP foi produzida no 3º, 6º, 9º e 20º dia de cultivo, respectivamente pelas linhagens *Aspergillus* sp (984), *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040). No 12º e 15º dia a produção de LiP foi

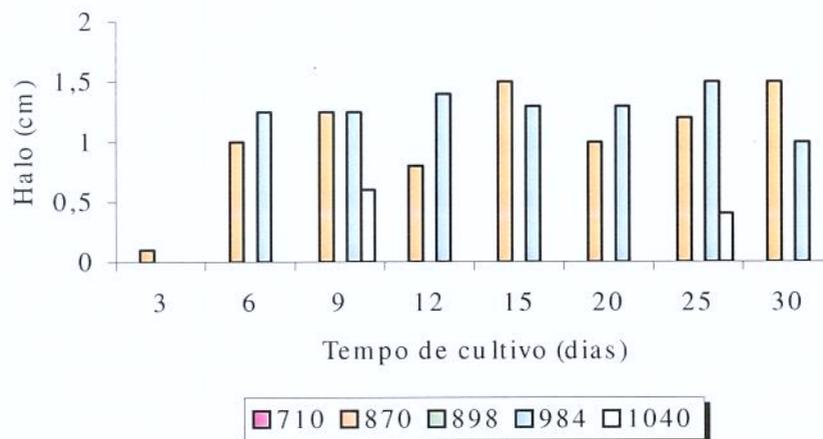
detectada no sobrenadante das linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Verticillium* sp (1040). As linhagens que produziram LiP com 25 dias de cultivo foram *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984). No 30º dia detectou-se atividade de LiP no sobrenadante das linhagens *Acremonium* sp (710) e *Aspergillus* sp (984). Todas as linhagens foram capazes de produzir MnP (Fig. 50B) após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. Observou-se que no 25º e 30º dia todas as cinco linhagens apresentaram atividade desta enzima. A maior atividade de MnP, para todas as linhagens foi detectada no 30º dia de cultivo. De acordo com a Figura 50C, verificou-se que nenhuma das linhagens produziram atividade de lacase com 3 e 6 dias de cultivo. Enquanto que no 12º e 20º dia todas as linhagens apresentaram esta atividade, sendo que a linhagem *Acremonium* sp (710) e *Aspergillus* sp (984) apresentaram lacase, a partir do 9º até o 30º dia. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou atividade de lacase do 12º ao 30º dia. No 9º, 12º, 20º, 25º e 30º dia foi detectado atividade de lacase no sobrenadante da linhagem *Fusarium* sp (898). A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou esta atividade do 9º ao 20º dia de crescimento.

❖ **Atividade de biosurfactante**



**FIGURA 51:** Atividade de biosurfactante, aumento da absorbância produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia de cultivo, como fonte de carbono.

A produção de biosurfactante, como pode ser verificado na Figura 51, foi detectada no sobrenadante de todas as linhagens em todos os dias analisados. As linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984) produziram baixa quantidade deste composto durante o período. A linhagens *Acremonium* sp (710), *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram maior produção de biosurfactante no 20º, 6º e 9º dia de cultivo, respectivamente.



**FIGURA 52:** Atividade de biosurfactante por formação de halo, produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno, adicionado no 3º dia, como fonte de carbono.

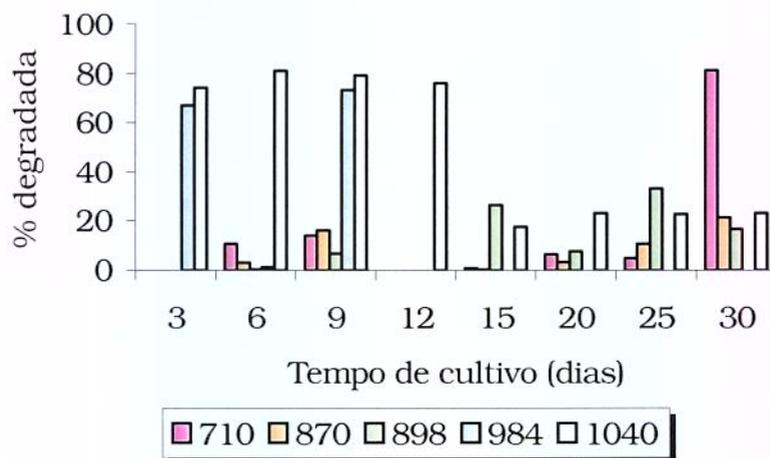
Já quanto à formação de halo (Fig 52), a linhagem *Acremonium* sp (710) e *Fusarium* sp (898) não apresentaram halo em nenhum dos dias analisados, a linhagem *Trichoderma* sp apresentou halo em todos os dias e a linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou formação de halo a partir do 6º dia de cultivo. A linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou este tipo de surfactante no 9º e 25º dia de cultivo.

#### ❖ Proteína citocromo P-450

Comparando os resultados obtidos da produção de cit P-450 pelas linhagens cultivadas em benzo[a]pireno, com os resultados obtidos anteriormente onde as linhagens foram crescidas nos demais HAPs, verificou-se que a produção de cit P-450 apresentou a maior frequência, e quando este composto foi adicionado no 3º dia os resultados foram semelhantes com as demais fontes de carbono. A linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou atividade desta proteína no 3º (0,0013 e

0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína), 6° (0,002 e 0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína), 9° (0,004 e 0,004 nmol mg<sup>-1</sup> proteína), 20° (0,005 e 0,005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) e 25° (0,001 e 0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) dia de cultivo, tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato. Quanto a produção de cit P-450 para a linhagem *Trichoderma* sp (870), detectou-se no 9° dia de cultivo (0,0004 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 12° dia (0,008 e 0,007 nmol mg<sup>-1</sup> proteína), tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato. A linhagem *Fusarium* sp (898) apresentou atividade desta proteína no 9° dia de cultivo (0,008 e 0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína), após tratamento com CO e adição de ditionato, no 12° dia (0,007 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 25° dia (0,005 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato. A linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou cit P-450 no 9° dia de crescimento (0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após adição de ditionato e no 20° e 25° dia (0,004 e 0,003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente) após tratamento com CO. Quanto a produção de citocromo pela linhagem *Verticillium* sp (1040) detectou-se esta proteína no 9° dia (0,0003 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e no 12° e 25° dia (0,004 e 0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente) após adição de ditionato e no 15° dia (0,001 e 0,001 nmol mg<sup>-1</sup> proteína) após tratamento com CO e adição de ditionato.

#### ❖ Degradação



**FIGURA 53:** Degradação de benzo[a]pireno, adicionado no 3° dia de cultivo, produzida pelas linhagens fúngicas.

Com base nos resultados mostrados na Figura 53, as cinco linhagens foram capazes de degradar benzo[a]pireno. As maiores taxas de degradação foram produzidas pelas linhagens *Acremonium* sp (710) e *Trichoderma* sp (870) no 30º dia, *Fusarium* sp (898) no 25º dia, *Aspergillus* sp (984) no 3º dia e no 6º dia para a linhagem *Verticillium* sp (1040).

Após estas análises utilizando benzo[a]pireno como fonte de carbono, adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo, observou-se que os melhores resultados de atividade enzimática e degradação foram obtidos quando o composto foi adicionado no 3º dia de crescimento.

A Tabela 10 relaciona o melhor tamanho de inóculo e o melhor dia para a degradação, pelas cinco linhagens, dos HAPs aqui estudados

**TABELA 10:** Seleção de melhor inóculo e dia de degradação produzida pelas linhagens nos diferentes HAPs.

| Linhagens              | Naftaleno           |    | Antraceno         |    | Pireno            |    | Benzo[a]pireno      |    |
|------------------------|---------------------|----|-------------------|----|-------------------|----|---------------------|----|
|                        | I                   | P  | I                 | P  | I                 | P  | I                   | P  |
| <i>Acremonium</i> sp   | 1 cm <sup>2</sup>   | 6  | 1 cm <sup>2</sup> | 15 | 1 cm <sup>2</sup> | 15 | 3x1 cm <sup>2</sup> | 30 |
| <i>Trichoderma</i> sp  | 1 cm <sup>2</sup>   | 6  | 1 cm <sup>2</sup> | 15 | 1 cm <sup>2</sup> | 20 | 3x1 cm <sup>2</sup> | 30 |
| <i>Fusarium</i> sp     | 1 cm <sup>2</sup>   | 12 | 1 cm <sup>2</sup> | 15 | 1 cm <sup>2</sup> | 15 | 3x1 cm <sup>2</sup> | 25 |
| <i>Aspergillus</i> sp  | 1 cm <sup>2</sup>   | 6  | 1 cm <sup>2</sup> | 15 | 1 cm <sup>2</sup> | 30 | 3x1 cm <sup>2</sup> | 9  |
| <i>Verticillium</i> sp | 2x1 cm <sup>2</sup> | 12 | 1 cm <sup>2</sup> | 6  | 1 cm <sup>2</sup> | 6  | 3x1 cm <sup>2</sup> | 6  |

I: Tamanho de inóculo selecionado; P: período de melhor degradação (dias).

Com base nos resultados obtidos verificou-se que a enzima predominante durante todo o experimento, utilizando as quatro fontes de carbono, foi MnP sendo produzida em maior quantidade pelas linhagens. Estes resultados estão de acordo com os reportados por BOGAN & LAMAR (1996), onde a enzima predominante produzida pelo fungo basidiomiceto *Phanerochaete laevis* HHB-1625, utilizando antraceno, fenantreno, benzo[a]antraceno e benzo[a]pireno foi MnP com baixa produção de lacase. A enzimologia do fungo *P. laevis* difere

da enzimologia do *P. chrysosporium* o qual produz uma grande quantidade de MnP e LiP e pouca ou nenhuma atividade de lacase (KATAGIRI et al., 1995). Estudos com *Ceriporiopsis subvermispora* indicaram que transformação significativa e mineralização de ligninas podem ocorrer na ausência de níveis detectáveis de LiP (SREBOTINIC et al., 1994), e atividades de MnP e lacase são suficientes para iniciar a degradação da lignina (PICKARD et al., 1999). Este trabalho descreve a habilidade de fungos não basidiomicetos, nos quais o sistema ligninolítico é dominado por MnP, em causar grande transformação de HAPs. MnP produz  $Mn^{+3}$ , a qual é capaz de oxidar HAPs com potencial de ionização superior a 7.7 eV (CAVALIERI & ROGAN, 1985). O potencial de ionização dos compostos utilizados aqui está próximo a este valor (antraceno 7,55 eV; pireno 7,72 eV; e benzo[a]pireno 7,12 eV).

A produção das enzimas neste trabalho esta de acordo com BEZALEL et al., (1996), que estudando a degradação de HAPs pelo fungo de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* verificou que a atividade das enzimas ligninolíticas não atingiu seu máximo valor ao mesmo tempo e nem no máximo valor de degradação. Podendo outras enzimas, como a citocromo P-450, estar envolvida na degradação primária destes HAPs, e as enzimas ligninolíticas degradariam este composto após o ataque inicial do cit P-450.

A degradação de benzo[a]pireno ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) pelo fungo de decomposição branca *Bjerkandera* sp BOS55 foi estudada por KOTTERMAN et al., (1998), o qual mostrou que esta linhagem foi capaz de degradar este composto após 1, 5 e 15 dias (91, 96 e 100%, respectivamente), e que a adição de Tween 80 melhorou a biodisponibilidade deste composto para a biodegradação. Os resultados obtidos por este autor são semelhantes a outros trabalhos, embora o resultado da biodegradação dependa fortemente da linhagem fúngica utilizada, como verificado neste estudo.

Segundo NOVOTNÝ et al, (2000), *Irpex lacteus* produziu simultaneamente MnP, LiP e lacase, sendo similar a *Phlebia radiata* e *Trametes versicolor* (HATAKKA, 1994). A capacidade de *I. lacteus* em remover antraceno (20 ppm) do meio líquido foi comparável a *T. versicolor*, *B. adusta* e *Ramaria* sp utilizados por FIELD et al., (1992). MnP e lacase foram detectadas no meio líquido de *I. lacteus*, tendo um papel na degradação de HAPs (JOHANNES et al., 1996).

Foi reportado que o potencial de solubilização de naftaleno foi maior quando houve produção de biosurfactantes (caracterizado como uma mistura de glicosídeos, consistindo de

trealose e um complexo conteúdo de ácidos graxos e micólico), do que com a adição do surfactante sintético (Tween 80). A razão para esse aumento na solubilização deve estar relacionada com o maior volume micelar, formado pelo biosurfactante, que acomoda uma maior quantidade de hidrocarbonetos (KANGA et al., 1997). BOYLE et al., (1998) sugeriu que a adição de surfactantes (Tween 80 ou Triton X-100) na concentração de 5-15% no solo pode aumentar a acessibilidade para fungos de degradação branca degradarem benzo[a]pireno, sem interferir no crescimento das linhagens. De acordo com SCHIPPERS et al., 2000, o biosurfactante produzido por *Sphingomana yanoikuyae* exibiu um aumento efetivo na degradação de fenantreno em cultura líquida, o qual pode ser repetido também em cultivo no solo (10%). O aumento da taxa de degradação máxima e o decréscimo de contaminantes residuais foram detectados no meio líquido.

Estudos do citocromo P-450 tem sido limitado devido a problemas em isolar a enzima ativa e ao baixo conteúdo específico em algumas espécies (MASSAPHY *et al.*, 1996). De acordo com ASPERGER et al., 1999, o maior problema, na detecção de cit P-450 em toda a célula, deve ser solucionado estabelecendo um método apropriado para determinação de cit P-450. Foi possível detectar e quantificar cit P-450 durante estudos utilizando toda a célula, o qual deve ser o método mais indicado para quantificar cit P-450. A razão para a insuficiente evidencia direta de cit P-450 em fungos filamentosos são as dificuldades no manuseio do micélio, o baixo nível de citP-450, o qual é freqüentemente mascarado pelo citocromo *aa*<sub>3</sub> na análise em espectro, e a mínima compreensão da regulação de cit P-450 em fungos. Uma solução é a obtenção de células de cit P-450 induzidas, o qual pode ter algum sucesso utilizando *n*-hexano como um indutor, uma maneira que alguns pesquisadores utilizaram para selecionar cit P-450 de bactérias e leveduras (ASPERGER et al., 1994). Esta indução foi útil para detecção de cit P-450 e também melhorou os detalhes do experimento, em estudos de regulação e produção cit P-450. Segundo SUZUKI et al., (1993), o nível de citocromo P-450 (900 pmol g<sup>-1</sup> peso seco), nas células induzidas de *M. alpina* é similar ao observado para outros fungos filamentosos. MASAPHY et al (1999) detectou atividade de cit P-450 de 0,75 nmol produto. Os resultados obtidos para citocromo neste trabalho variaram de um valor mínimo de 0,0005 a 0,07 nmol mg<sup>-1</sup> proteína, sendo que na presença de benzo[a]pireno a maioria das linhagens apresentaram cit P-450, após os dois tipos de tratamento (CO e adição de ditionato), sendo este o melhor substrato para a produção de citocromo.

As concentrações de HAPs utilizadas para crescimento das cinco linhagens fúngicas (naftaleno 0,05%, antraceno 0,1%; pireno 0,05% e benzo[a]pireno 0,05%), são de cinco a dez vezes superiores as reportadas na literatura, tanto para fungos basidiomicetos ligninolíticos como para deuteromicetos, e as porcentagens de degradação obtida após o crescimento das linhagens é geralmente igual ou maior aquelas relatadas na literatura, onde o envolvimento das enzimas ligninolíticas e a participação de enzimas do sistema citocromo P-450, são relatados como agentes importantes da degradação; todavia, o mecanismo completo de degradação através deste dois sistemas ainda não é totalmente conhecido (RAVELET et al., 2000; ANDERSSON et al., 2000; PICKARD et al., 1999; BOYLE et al., 1998; BOGAN & LAMAR, 1996).

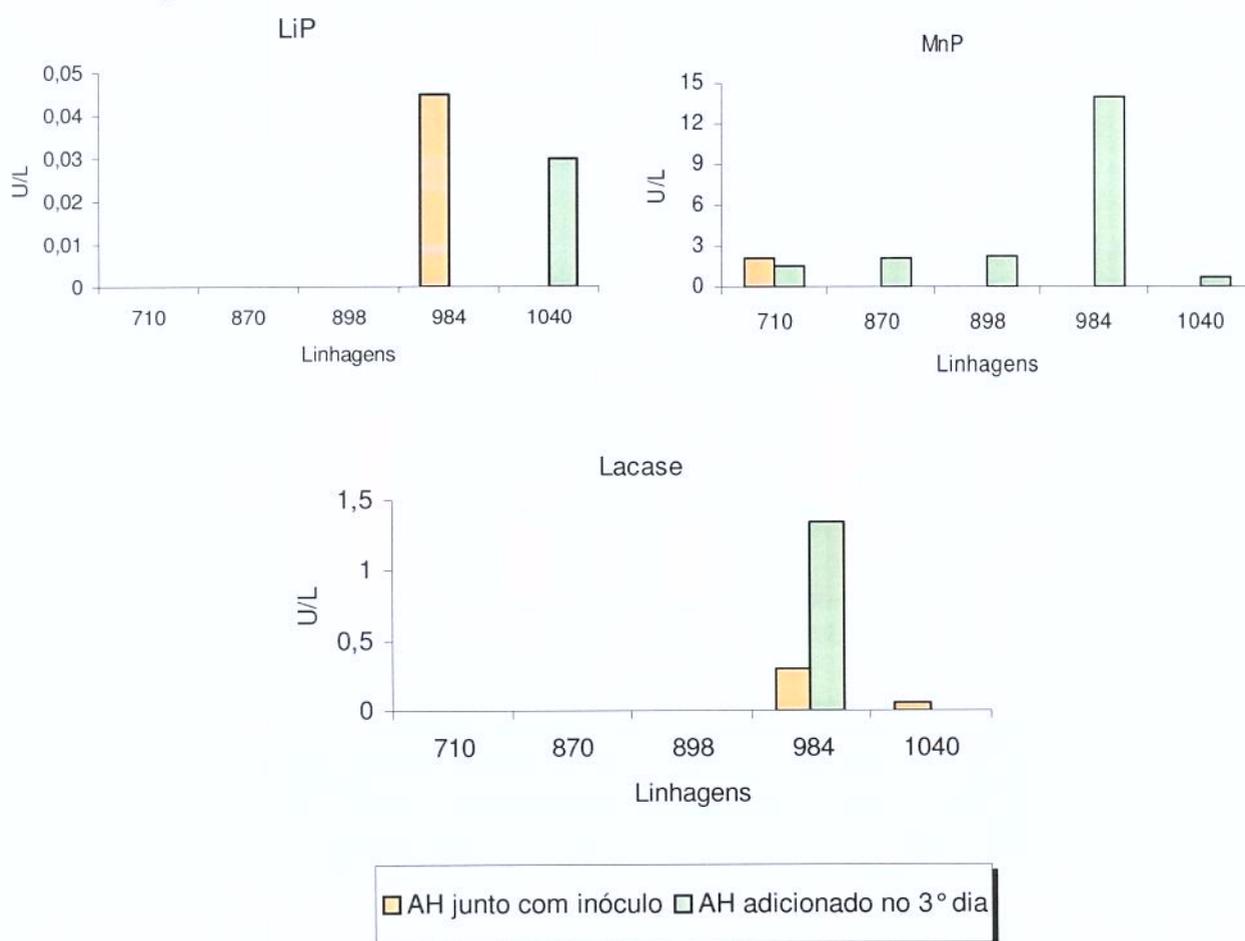
## INFLUÊNCIA DE ÁCIDO HÚMICO NA DEGRADAÇÃO DE HAPs

### 5.5. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO NA DEGRADAÇÃO DOS HAPs

#### 5.5.1. Naftaleno

As Figuras abaixo mostram a ação do ácido húmico (AH), adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo, na degradação de naftaleno, adicionado ao meio de cultura somente no 3º dia.

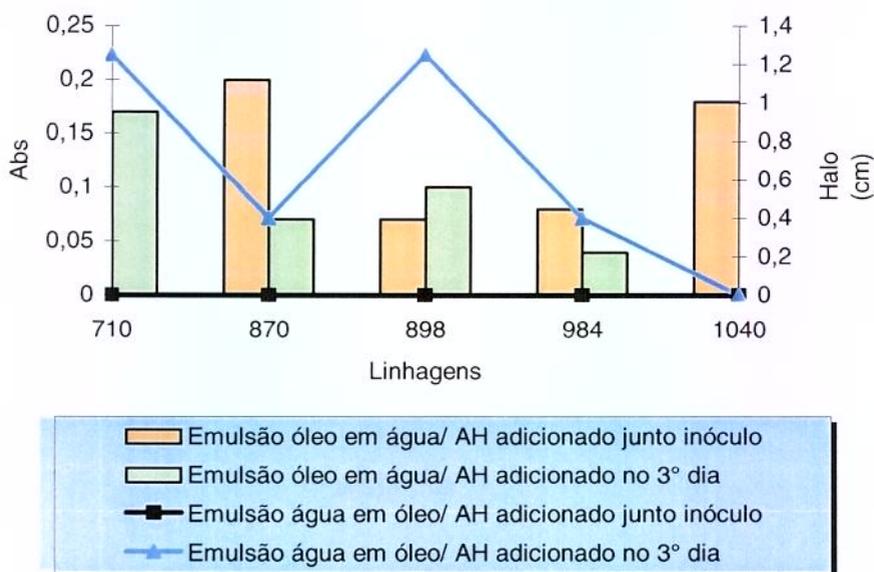
#### Enzimas ligninolíticas



**FIGURA 54:** Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono.

Após determinação das atividades ligninolíticas (Fig. 54) – LiP, MnP e lacase – observou-se que as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Fusarium* sp (898) não produziram atividades de LiP e lacase nem quando o ácido húmico foi adicionado junto com o inóculo nem quando adicionado no 3º dia de cultivo. Detectou-se atividade de LiP no sobrenadante das linhagens *Aspergillus* sp (984) quando o ácido húmico foi adicionado junto com o inóculo e na linhagem *Verticillium* sp (1040) quando da adição no 3º dia de cultivo. A linhagem *Acremonium* sp (710) produziu atividade de MnP tanto da adição junto com o inóculo como da adição no 3º dia de crescimento. As linhagens *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898), *Aspergillus* sp (984) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram atividade de MnP quando da adição do ácido húmico no 3º dia de cultivo. A atividade de lacase foi detectada nos sobrenadantes das linhagens *Aspergillus* sp (984), adição de ácido húmico junto e no 3º dia, e *Verticillium* sp (1040) quando adicionou-se o ácido húmico junto com o inóculo.

#### Atividade de biosurfactante

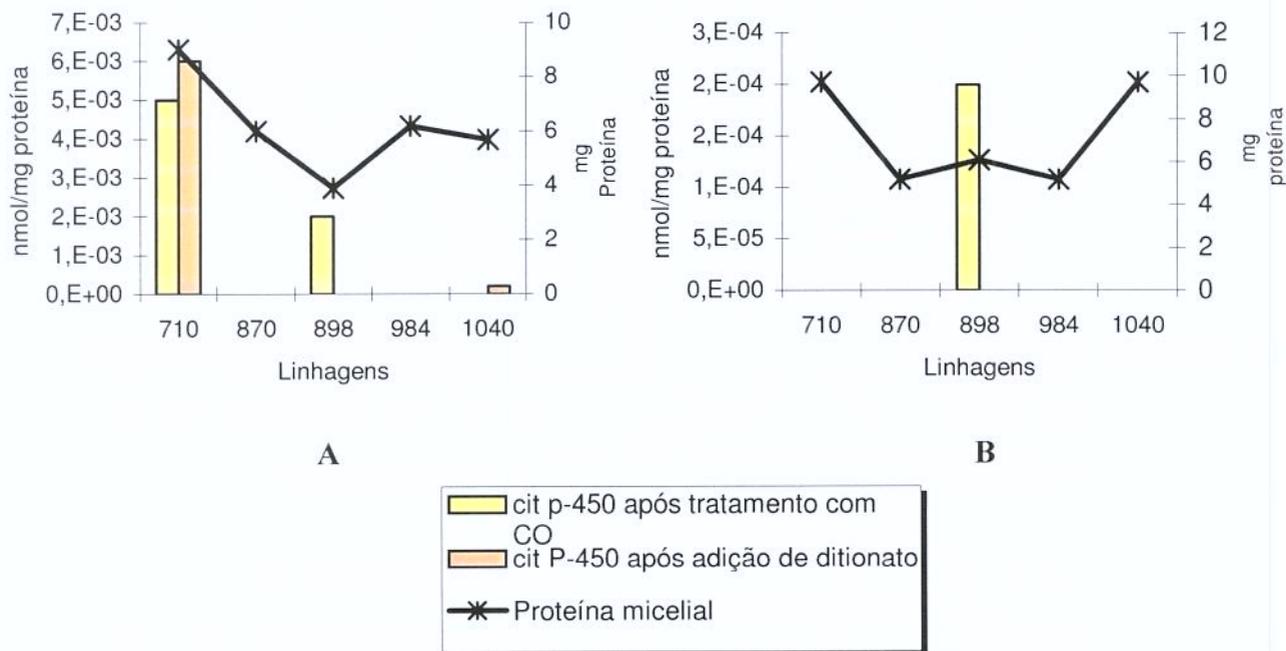


**FIGURA 55:** Atividade de biosurfactante produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono.

Observou-se que todas as linhagens (Fig. 55) produziram atividade de biosurfactante, quando o ácido húmico foi adicionado junto com o inóculo ou quando foi adicionado no 3º dia de crescimento. Quanto à formação de halo, quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia, as

linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) produziram este tipo de biosurfactante, a linhagem *Verticillium* sp (1040) não produziu este tipo de emulsão. Quando da adição do composto junto com o inóculo não houve a formação de halo por nenhuma das linhagens aqui estudadas.

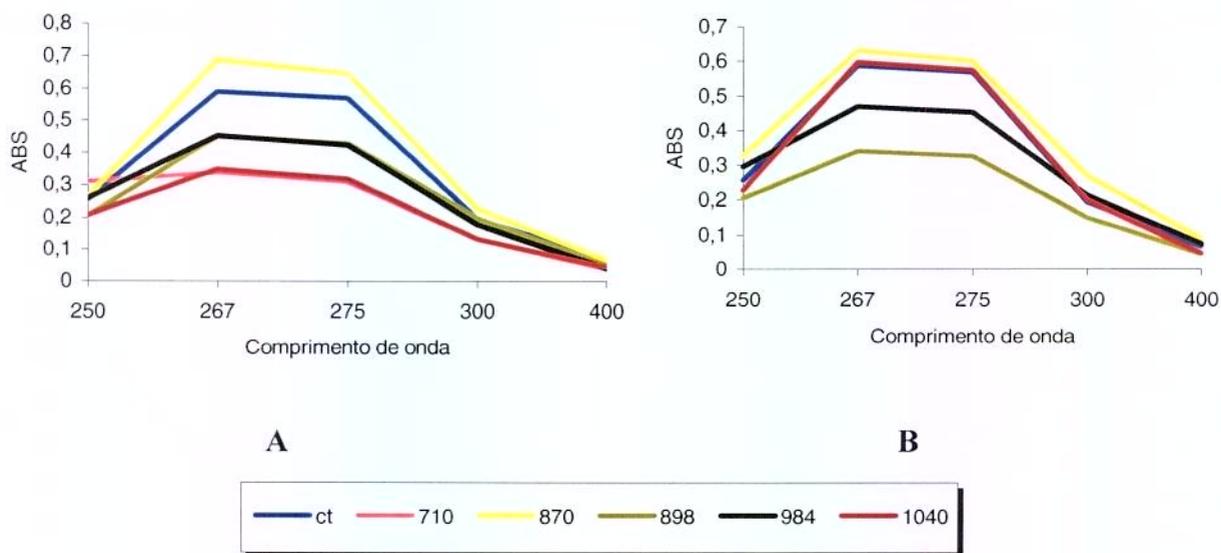
### Produção de proteínas micelial e citocromo P-450



**FIGURA 56:** Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo.

Conforme mostra a Figura 56, houve produção de citocromo P-450 pelas linhagens, sendo os melhores resultados obtidos quando o ácido húmico foi adicionado ao meio de cultivo junto com o inóculo (Fig.56A). Quanto à produção de proteína micelial, as linhagens produziram quantidades semelhantes tanto quando o composto foi adicionado junto com o inóculo como no 3º dia de cultivo (Fig 56B), sendo que as linhagens *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram aumento na produção de proteína quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia de cultivo.

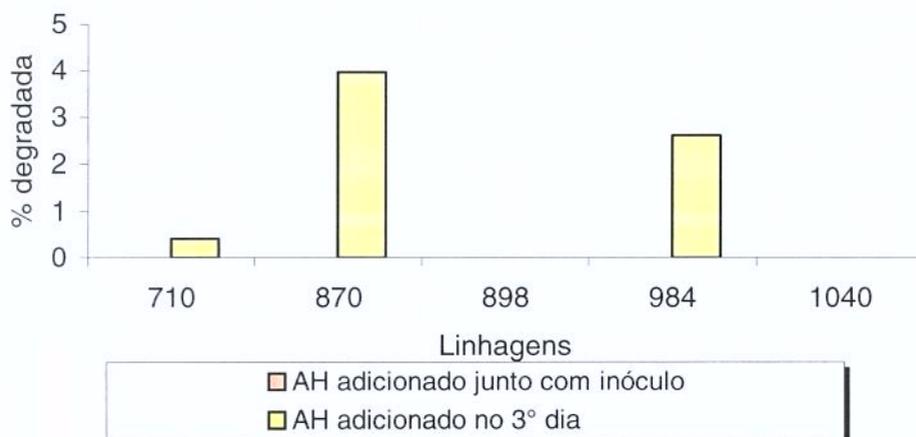
### Descoloração do ácido húmico na presença de naftaleno



**FIGURA 57:** Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.

Quanto a descoloração do ácido húmico na presença de naftaleno observou-se que todas as linhagens, exceto a *Trichoderma* sp (870), descoloriram o meio de cultivo quando o composto foi adicionado juntamente com o inóculo (Fig. 57A), sendo que a linhagem *Verticillium* sp (1040) apresentou a melhor descoloração do meio, quando comparada com o controle. Na adição do ácido húmico no 3º dia (Fig. 57B) observou-se que houve uma pequena descoloração, sendo que as linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram um escurecimento do meio de cultivo.

## Degradação



**FIGURA 58:** Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em naftaleno como fonte de carbono.

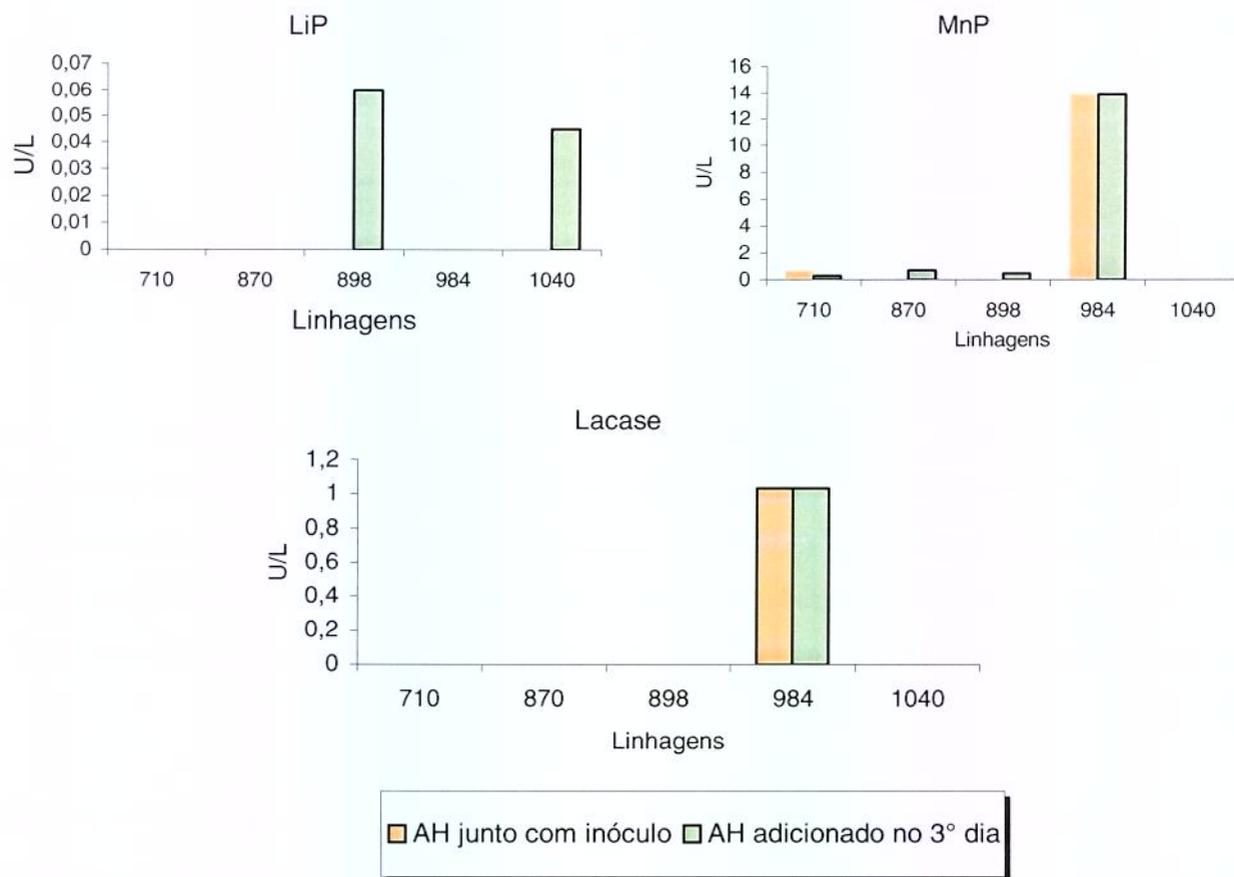
Conforme mostra a Figura 58, houve uma pequena degradação do naftaleno, quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia de cultivo. A linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou a melhor degradação de naftaleno (3,97%). As linhagens *Aspergillus* sp (984) e *Acremonium* sp (710) também conseguiram degradar este composto (2,64% e 0,41%, respectivamente). Não houve degradação de naftaleno quando o ácido húmico foi adicionado ao meio junto com o inóculo.

Esta pequena ou nenhuma degradação pode estar relacionada com a adição de ácido húmico, pois aparentemente as linhagens tiveram preferência em degradar este composto, indicada pela descoloração do ácido húmico a qual foi maior quando este foi adicionado junto com o inóculo e onde não houve nenhuma degradação de naftaleno.

### 5.5.2. Antraceno

As figuras abaixo mostram a ação do ácido húmico (AH), adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo, na degradação de antraceno o qual foi adicionado ao meio de cultura somente no 3º dia, em ambos os casos.

#### Atividades ligninolíticas

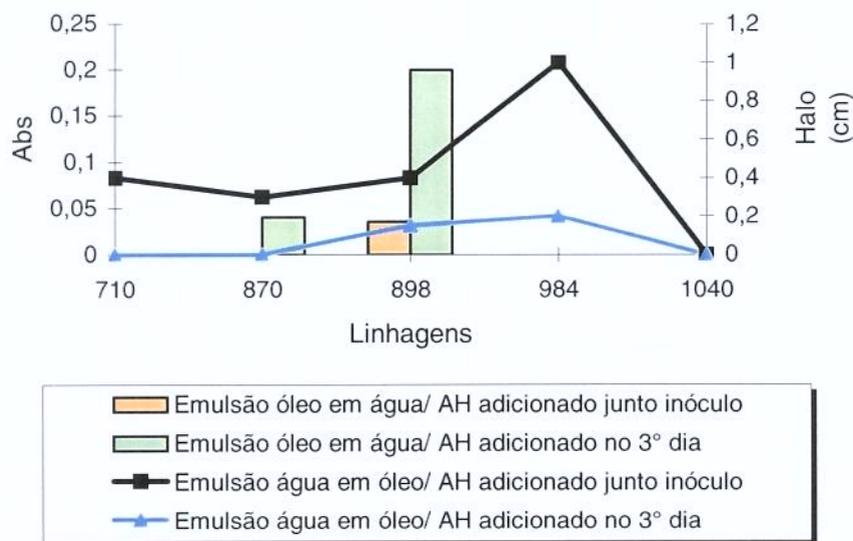


**FIGURA 59:** Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono.

A produção de LiP (Fig. 59A) foi detectada nos sobrenadantes das linhagens *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040), quando o ácido húmico foi adicionado ao meio no 3º dia de cultivo. A atividade de MnP (Fig.59B) foi detectada nos sobrenadantes das linhagens *Acremonium* sp (710) e *Aspergillus* sp (984) tanto quando o ácido húmico foi adicionado ao meio junto como no 3º dia. Nos sobrenadantes das linhagens *Trichoderma* sp (710) e *Fusarium* sp

(898) esta atividade foi detectada somente quando o composto foi adicionado no 3º dia de cultivo e a linhagem *Verticillium* sp (1040) não apresentou atividade de MnP. Quanto a produção de lacase (Fig. 59C) esta foi apresentada somente pela linhagem *Aspergillus* sp (984) tanto quando o composto foi adicionado ao meio junto como no 3º dia de cultivo.

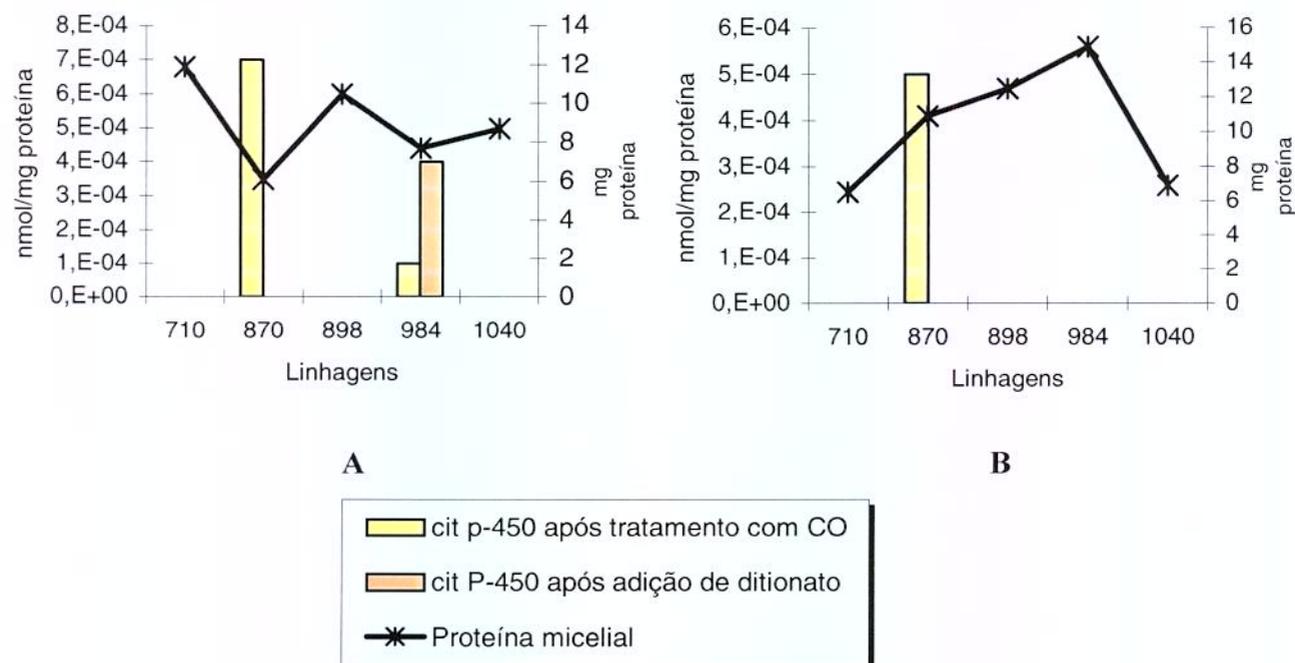
### Atividade de biosurfactante



**FIGURA 60:** Atividade de biosurfactante das linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono

Com base nos resultados mostrados na Figura 60, verificou-se que as linhagens não produziram aumento da absorbância exceto as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Trichoderma* sp (870) quando se adicionou ácido húmico no 3º dia e *Fusarium* sp (898) que provocou aumento da absorbância tanto quando o composto foi adicionado junto com o inóculo, como no 3º dia de crescimento. Quanto à formação de halo observou-se que quando a adição ocorreu junto com o inóculo todas as linhagens formaram halo, exceto a linhagem *Verticillium* sp (1040), sendo que a linhagem *Aspergillus* sp (984) foi a que produziu maior halo (1,0 cm). Quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia somente as linhagens *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) apresentaram este tipo de emulsificante.

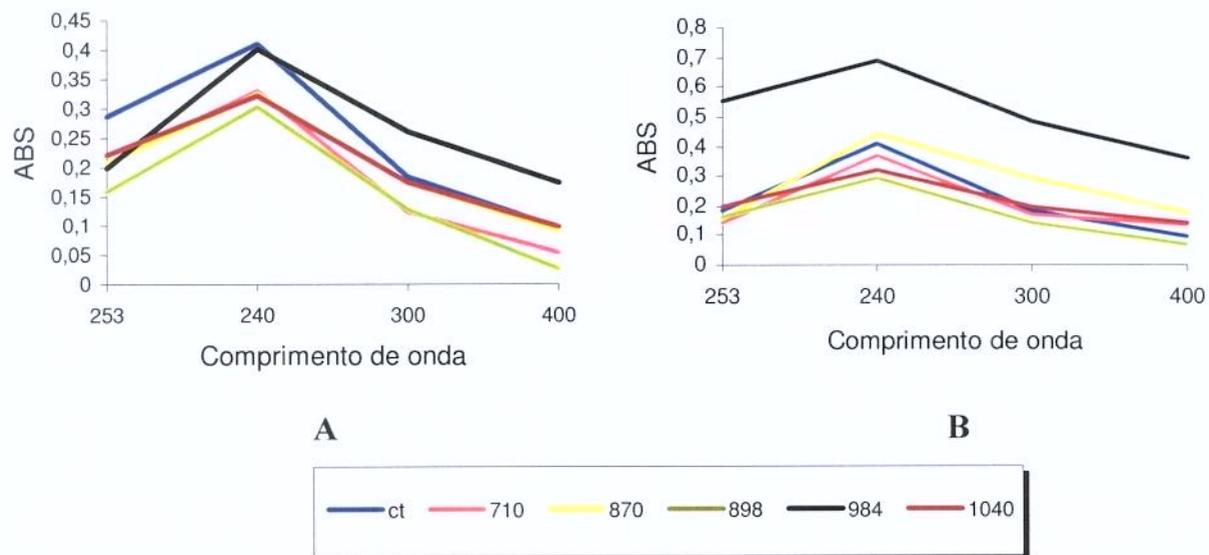
Proteínas micelial e P-450



**FIGURA 61:** Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo.

Observou-se na Figura 61, que as únicas linhagens a apresentarem produção de cit P-450, tanto após a adição junto como no 3º dia, foram *Trichoderma* sp (870) (após tratamento com CO e adição de ácido húmico junto com o inóculo) e *Aspergillus* sp (984) que apresentou tanto após tratamento com CO como após adicionar ditionato, quando o composto foi adicionado junto com o inóculo (Fig 61A). A produção de proteína foi semelhante em ambos os casos avaliados, exceto para a linhagem *Aspergillus* sp (984), a qual apresentou um aumento significativo quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia de crescimento (Fig 61B).

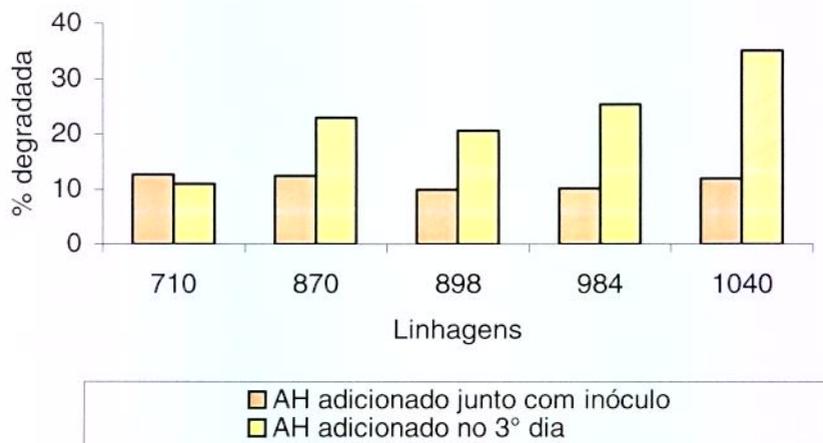
**Descoloração do ácido húmico na presença de antraceno**



**FIGURA 62:** Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.

Conforme mostrado na Figura 62, as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Verticillium* sp (1040) apresentaram uma pequena descoloração do meio de cultivo quando o ácido húmico foi adicionado ao meio junto com o inóculo (Fig 62A). Na Fig 62B observa-se que praticamente não houve descoloração do meio de cultivo e a linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou um escurecimento do meio, quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia de crescimento.

## Degradação



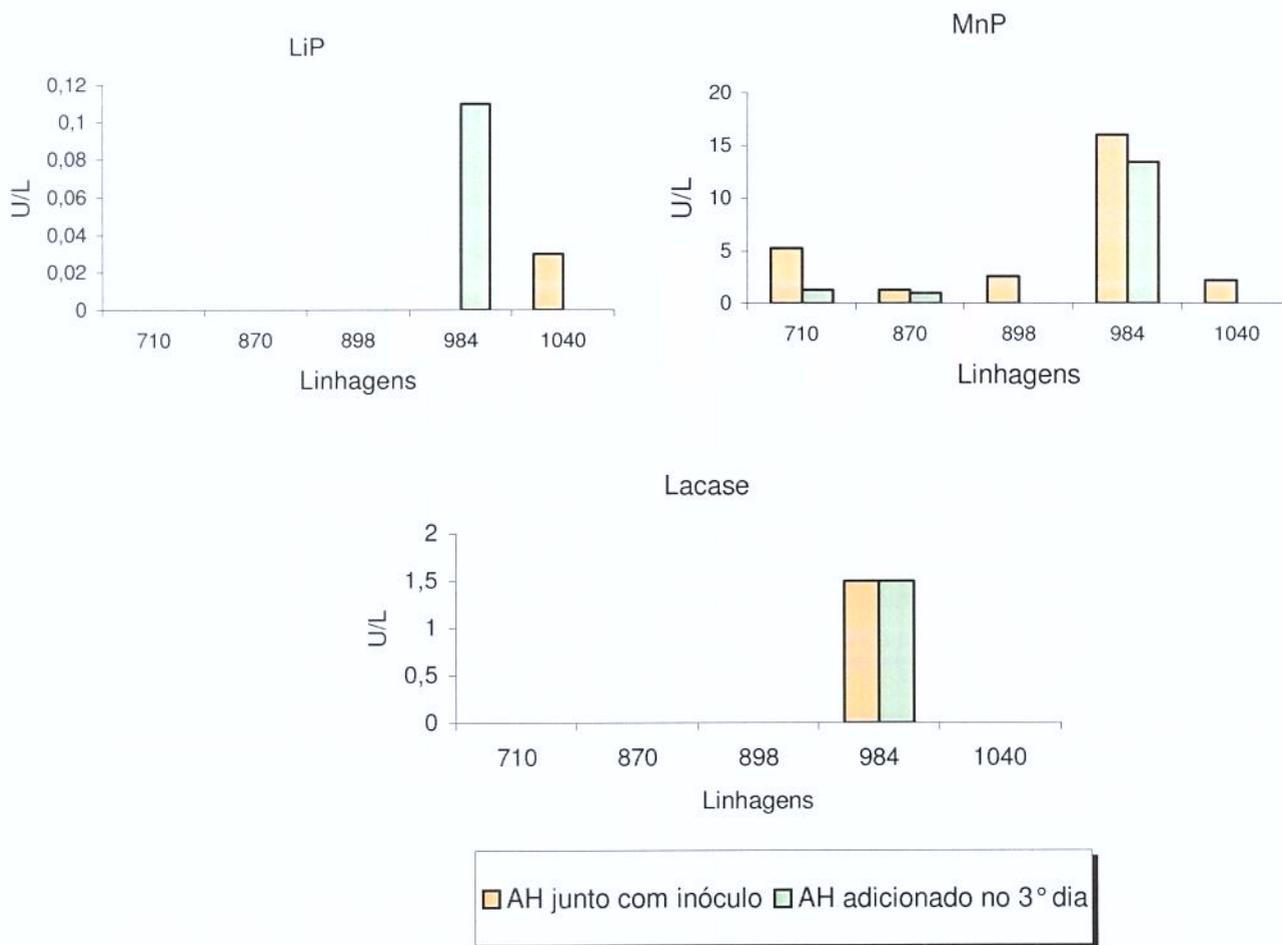
**FIGURA 63:** Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em antraceno como fonte de carbono.

A Figura 63 mostra os valores de degradação produzidos pelas linhagens. Observa-se que quando o ácido húmico foi adicionado ao meio de cultura no 3º dia houve um aumento da degradação deste composto, quando comparado com a adição juntamente com o inóculo, este aumento deve estar relacionado com a descoloração desde que com a adição do composto no 3º dia praticamente não produziu descoloração do meio de cultivo.

### 5.5.3. Pireno

As figuras abaixo mostram a ação do ácido húmico, adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo, na degradação de pireno o qual foi adicionado ao meio de cultura somente no 3º dia, em ambos os casos.

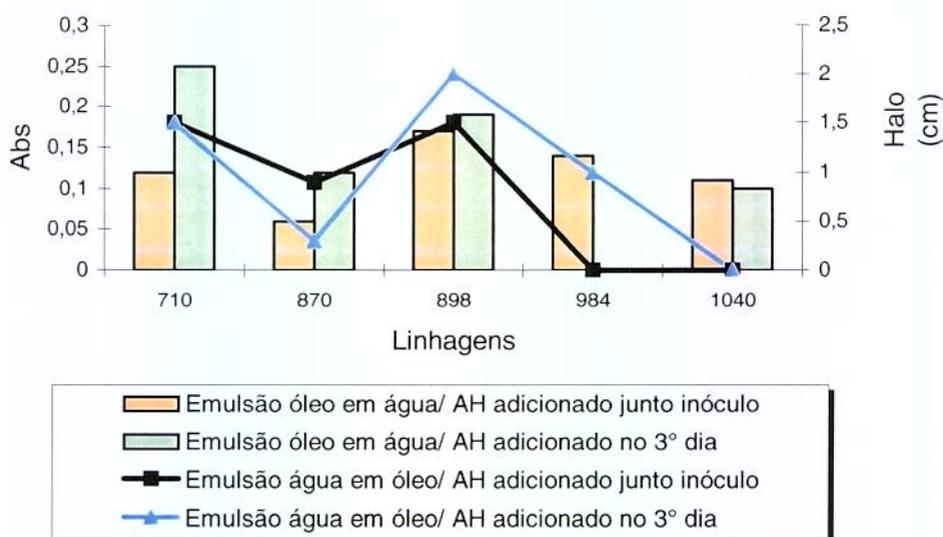
### Atividades ligninolíticas



**FIGURA 64:** Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono.

Conforme visto na Figura 64, a produção de atividade de LiP foi detectada somente nos sobrenadantes das linhagens *Aspergillus* sp (984) (adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo), e *Verticillium* sp (1040) (adição do composto junto com o inóculo). Quanto a produção de MnP todas as linhagens produziram esta atividade quando o composto foi adicionado ao meio junto com o inóculo. As linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984) também produziram atividade de MnP quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia de crescimento. A atividade de lacase foi detectada somente no sobrenadante da linhagem *Aspergillus* sp (984), em ambos os casos estudados (composto adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo).

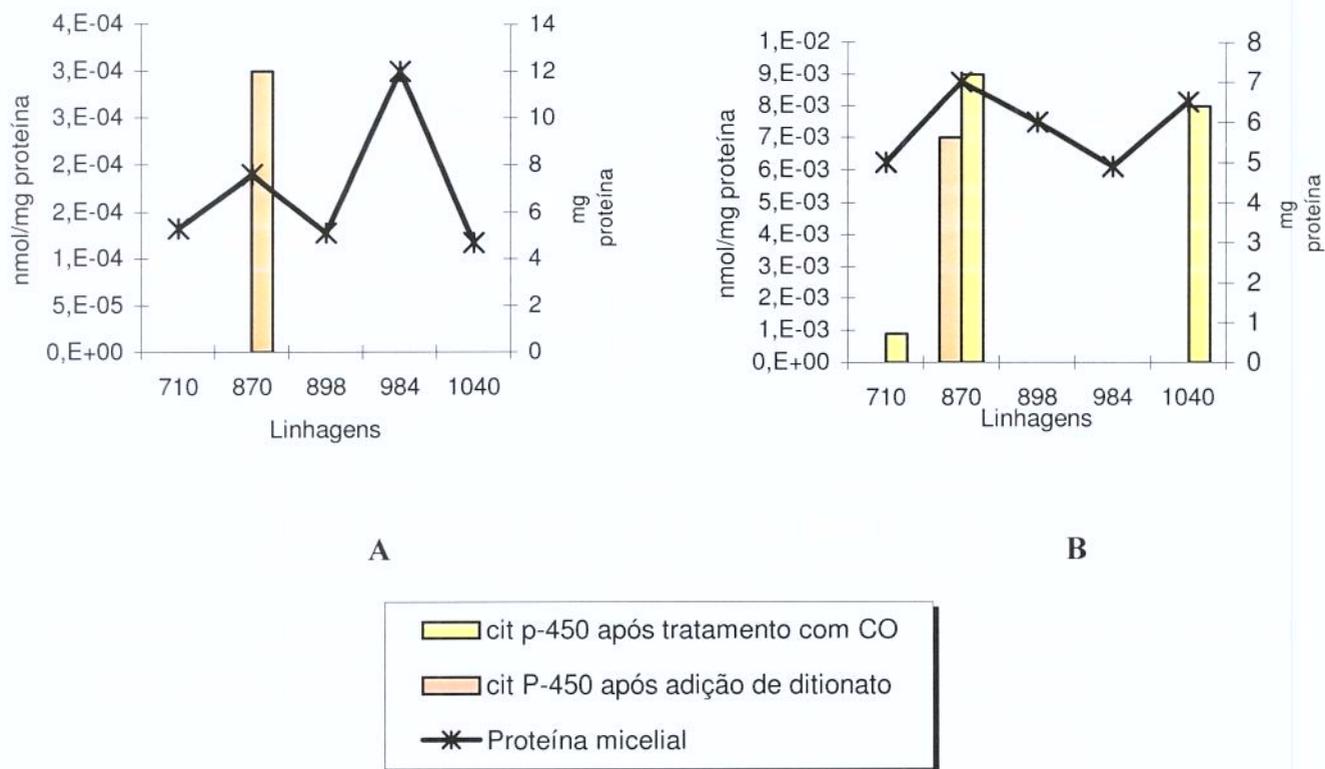
### Atividade de biosurfactante



**FIGURA 65:** Atividade de biosurfactante das linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono.

Conforme mostra a Figura 65, todas as linhagens produziram biosurfactante (aumento da absorbância e formação de halo). Quanto ao aumento da absorbância, todas as linhagens produziram este tipo de surfactante quando o composto foi adicionado junto como no 3º dia, sendo que neste último caso somente a linhagem *Aspergillus* sp (984) não apresentou aumento de absorbância. Quanto à produção de halo somente as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Fusarium* sp (898) apresentaram este tipo de emulsão, quando adicionou o ácido húmico junto com o inóculo. Quando a adição ocorreu no 3º dia de crescimento todas as linhagens apresentaram formação de halo, exceto a linhagem *Verticillium* sp (1040).

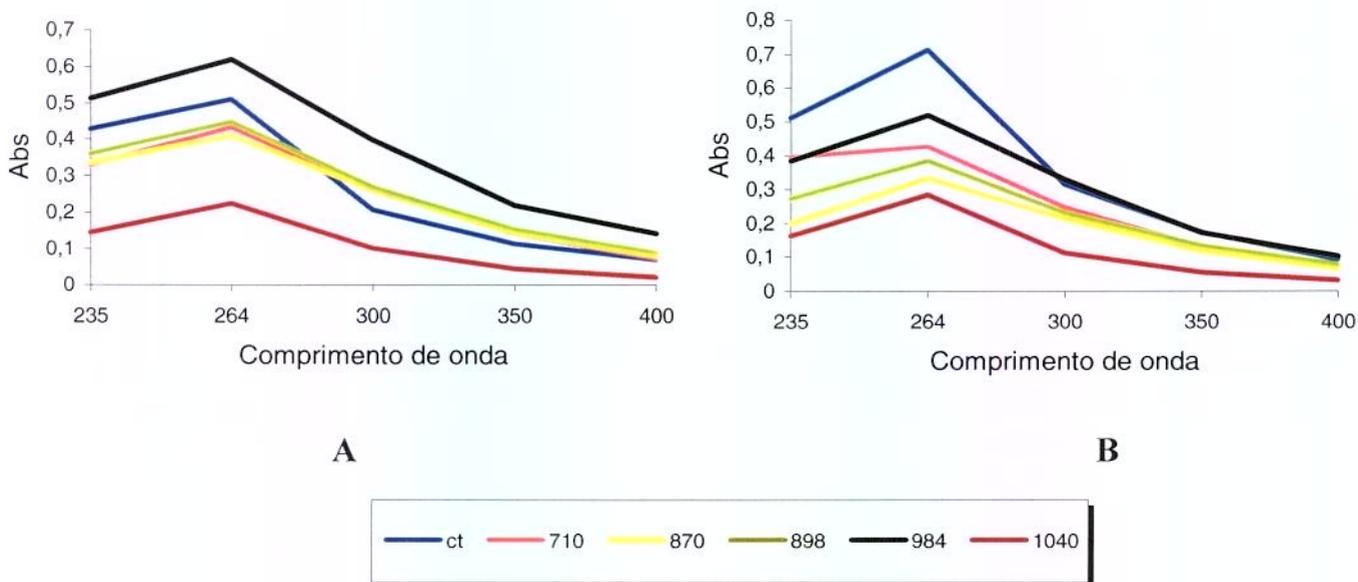
Proteínas micelial e citocromo P-450



**FIGURA 66:** Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono. A.adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B.adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo.

Como mostrado na Figura 66, a única linhagem a produzir cit P-450c foi a *Trichoderma* sp (870) (composto adicionado junto com o inóculo) após adição de ditionato. Quando o composto foi adicionado no 3º dia, as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Verticillium* sp (1040) produziram cit P-450 após adição de ditionato e a linhagem *Trichoderma* sp (870) apresentou cit P-450 tanto após tratamento com CO como após adição de ditionato. Quanto à produção de proteína micelial as linhagens não apresentaram diferenças significativas quando o ácido húmico foi adicionado junto ou no 3º dia, exceto a linhagem *Aspergillus* sp (984) a qual teve maior produção de proteína quando o composto foi adicionado junto com o inóculo.

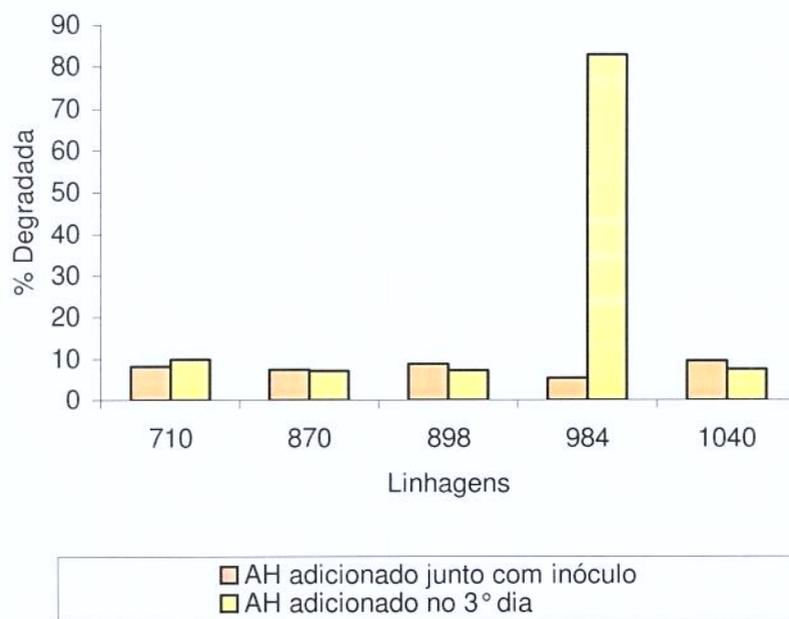
Descoloração do ácido húmico na presença de pireno



**FIGURA 67:** Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.

Com base nos resultados apresentados na Figura 67A, observou-se que todas as linhagens apresentaram descoloração do meio de cultivo, quando o ácido húmico foi adicionado ao meio junto com o inóculo, principalmente a linhagem *Verticillium* sp (1040), já a linhagem *Aspergillus* sp (984) apresentou um escurecimento do meio. Quando o composto foi adicionado ao meio no 3º dia (Fig. 67B) observou-se que todas as linhagens, sem exceção apresentaram descoloração do meio.

## Degradação



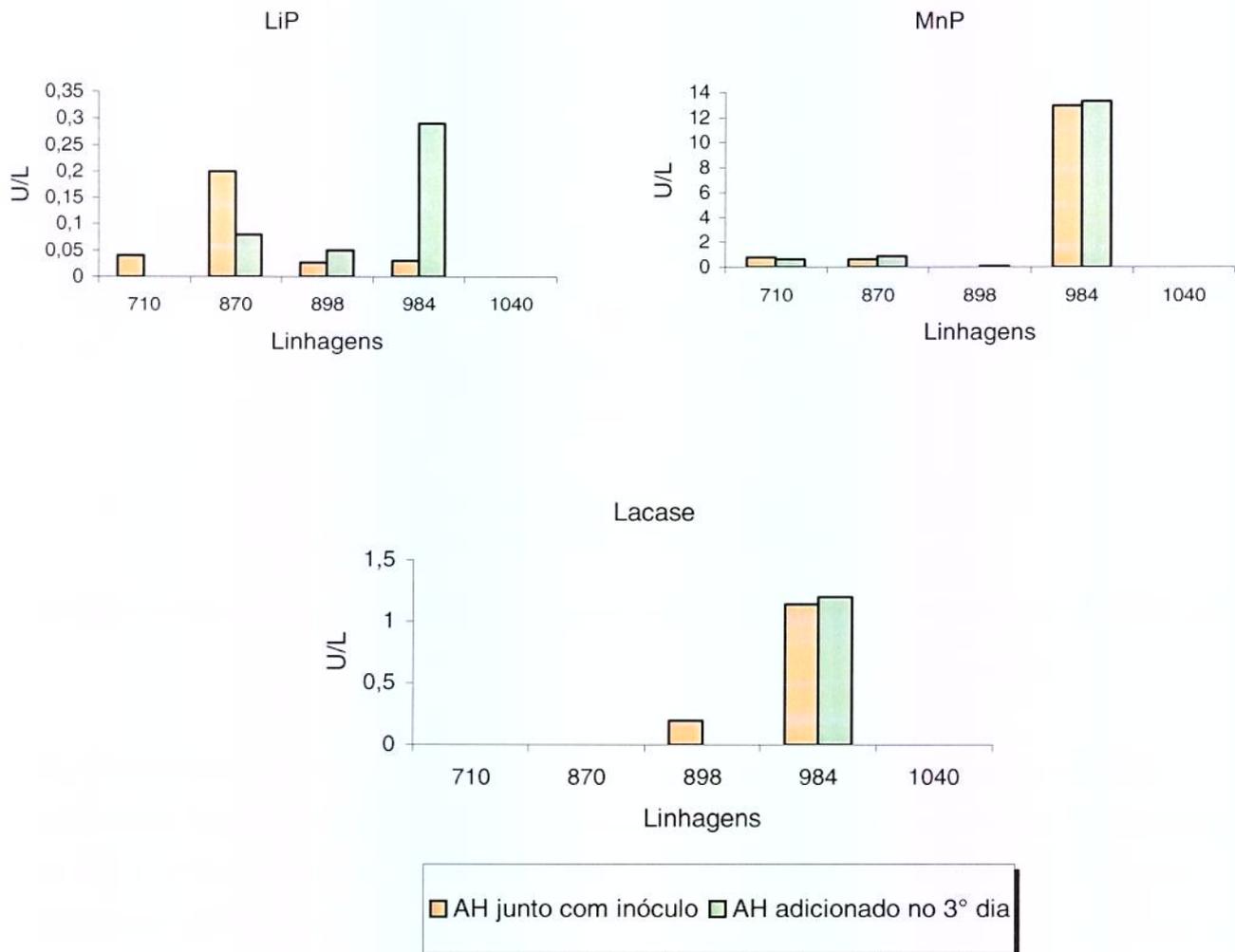
**FIGURA 68:** Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em pireno como fonte de carbono.

Quando pireno foi utilizado como fonte de carbono (Fig 68), a porcentagem de degradação foi superior aos outros dois HAPs utilizados anteriormente. A linhagem *Aspergillus* sp (984) (ácido húmico adicionado no 3º dia) produziu uma degradação superior a 80%. Todas as linhagens com exceção da linhagem *Aspergillus* sp (984), não apresentaram diferenças significativas quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia de cultivo.

### 5.5.4. Benzo[a]pireno

As figuras abaixo mostram a ação do ácido húmico, adicionado junto com o inóculo ou no 3º dia de cultivo, na degradação de benzo[a]pireno o qual foi adicionado ao meio de cultura somente no 3º dia, em ambos os casos.

Atividades ligninolíticas

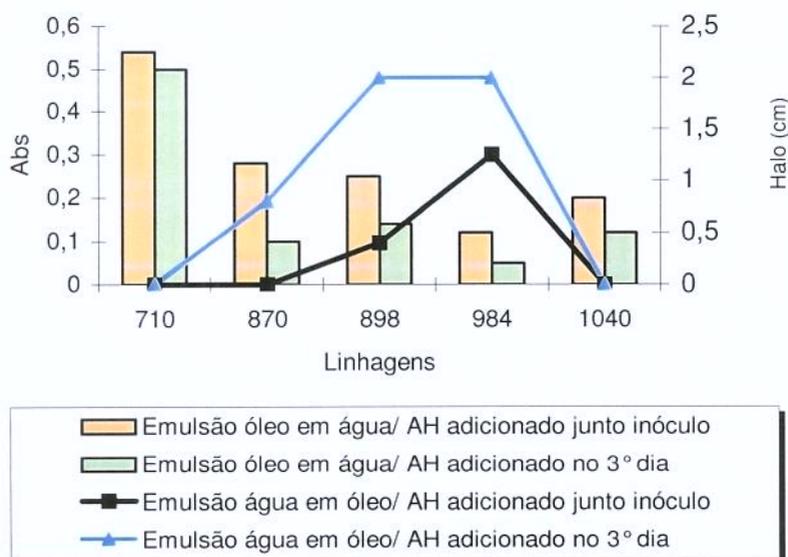


**FIGURA 69:** Atividades ligninolíticas produzidas pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono.

Conforme demonstra a Figura 69, a atividade de LiP foi detectada no sobrenadante das linhagens *Acremonium* sp (710) (adição de ácido húmico junto com o inóculo) *Trichoderma* sp (870), *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) (adição de ácido húmico junto e no 3º dia). Esta atividade não foi detectada no sobrenadante da linhagem *Verticillium* sp (1040). A atividade de MnP não foi produzida pela linhagem *Verticillium* sp (1040), enquanto que as linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Aspergillus* sp (984) produziram esta enzima tanto

quando o composto foi adicionado junto como no 3º dia e a linhagem *Fusarium* sp (898) somente quando da adição no 3º dia. A atividade de lacase não foi detectada no sobrenadante das linhagens *Acremonium* sp (710), *Trichoderma* sp (870) e *Verticillium* sp (1040). A linhagem *Fusarium* sp (898) produziu lacase quando adicionou-se o ácido húmico junto com o inóculo e a linhagem *Aspergillus* sp (984) quando da adição tanto junto como no 3º dia.

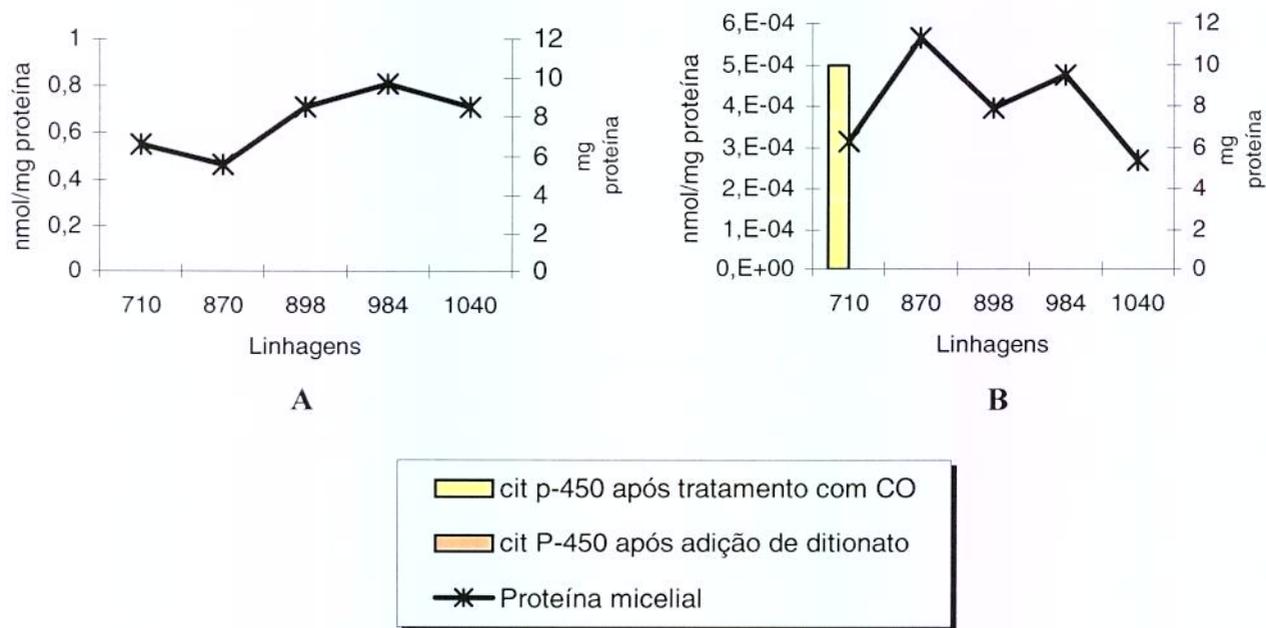
### Atividade de biosurfactante



**FIGURA 70:** Atividade de biosurfactante das linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono.

Conforme mostra a Figura 70, todas as linhagens apresentaram aumento da absorbância (adição de ácido húmico junto e no 3º dia). Quanto à produção de halo, quando adicionou o composto junto com o inóculo observou-se que somente as linhagens *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) apresentaram emulsão água em óleo quando adicionou o ácido húmico no 3º dia, além das duas linhagens já citadas a linhagem *Trichoderma* sp (870) também produziu halo, sendo que as linhagens *Fusarium* sp (898) e *Aspergillus* sp (984) apresentaram o valor máximo de halo (2 cm).

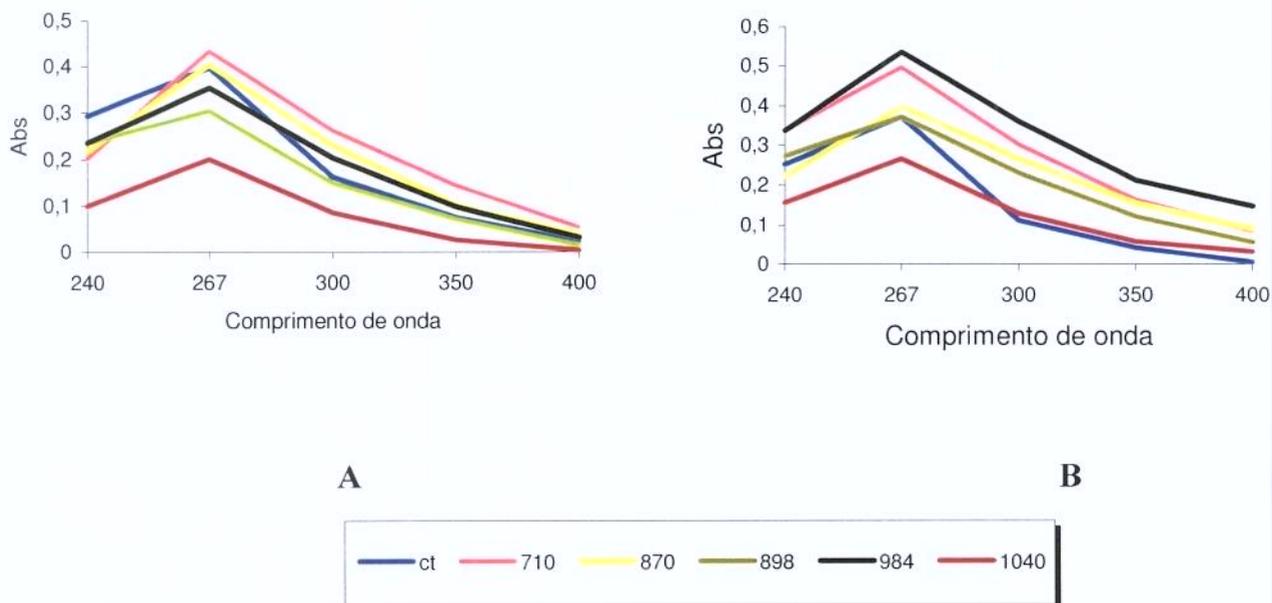
Proteínas micelial e citocromo P-450



**FIGURA 71:** Produção de citocromo P-450 e proteína micelial pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. A. adição de ácido húmico juntamente com o inóculo. B. adição de ácido húmico no 3º dia de cultivo.

A produção de cit P-450c (Fig. 71A) não foi detectada quando o ácido húmico foi adicionado junto com o inóculo, quando adicionado no 3º dia (Fig. 71B), somente a linhagem *Acremonium* sp (710) apresentou esta proteína após tratamento com CO. Quanto à produção de proteína micelial observa-se, que não houve grande variação tanto quando o composto foi adicionado junto ou no 3º dia de crescimento, exceto a linhagem *Trichoderma* sp (870) a qual teve um aumento na produção de proteína quando da adição no 3º dia e a linhagem *Verticillium* sp (1040) quando da adição junto com o inóculo.

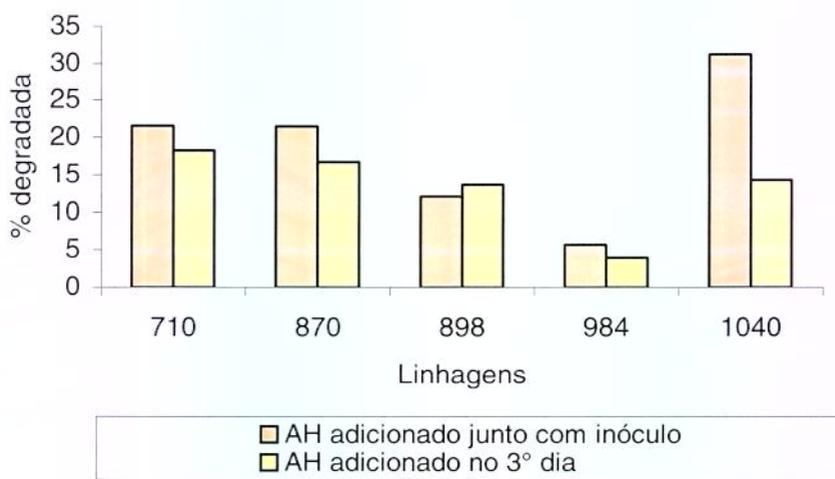
Descoloração do ácido húmico n presença de benzo[a]pireno



**FIGURA 72:** Descoloração do ácido húmico produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono. A. ácido húmico adicionado junto com o inóculo; B. ácido húmico adicionado no 3º dia de crescimento.

Como visto na Figura 72A, somente as linhagens *Fusarium* sp (898), *Aspergillus* sp (984) descoloriram o meio de crescimento, sendo que *Verticillium* sp (1040) produziu grande descoloração do meio de crescimento. Quando o ácido húmico foi adicionado no 3º dia (Fig 72B) as linhagens *Acremonium* sp (710) e *Aspergillus* sp (984) produziram um escurecimento no meio. As linhagens *Trichoderma* sp (870) e *Fusarium* sp (898) apresentaram o mesmo valor de absorvância que o controle, e a linhagem *Verticillium* sp (1040) descoloriu o meio de crescimento.

## Degradação



**FIGURA 73:** Degradação produzida pelas linhagens após crescimento em benzo[a]pireno como fonte de carbono.

Quando benzo[a]pireno foi utilizado como substrato (Fig 73), verificou-se que a maioria das linhagens apresentaram maior degradação quando o ácido húmico foi adicionado ao meio junto com o inóculo, somente a linhagem *Fusarium* sp (898) apresentou melhor degradação quando da adição no 3º dia de cultivo. A linhagem *Verticillium* sp (1040) além de descolorir o meio foi a que melhor degradou benzo[a]pireno (ácido húmico adicionado junto com o inóculo).

Após a adição do ácido húmico, o qual pode agir como surfactante melhorando assim a disponibilidade dos HAPs para a biodegradação fúngica, a degradação foi menor quando comparada com estudos anteriores, isto pode significar que as linhagens primeiramente utilizaram o ácido húmico como substrato e não os HAPs, desde que os sobrenadantes das linhagens apresentaram descoloração, com relação às atividades ligninolíticas não se verifica aumento da produção na presença de ácido húmico. COHEN & GABRIELE (1982), reportaram que o ácido húmico extraído de lignita serve como fonte primária de carbono. O resultado deste trabalho está de acordo com LESAGE et al., (1998 e 1999), onde concluíram que a presença do ácido húmico aumentou a concentração de HAPs na fase aquosa, mas a taxa de degradação não melhorou simultaneamente, sugerindo que os HAPs formam um complexo estável com o ácido húmico, o qual deve ser quebrado para que a utilização metabólica ocorra. LESAGE et al.,

(1997), também concluiu que a adição de ácido húmico no solo não melhorou a disponibilidade dos HAPs, sendo que a taxa de degradação dos compostos individuais parece ser governada principalmente pela população microbiana no solo capaz de degradá-los.

TEMP et al., (1999) estudaram a despolimerização de ácido húmico por 3 basidiomicetos (JF 596, *Polyporus ciliatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*), e observaram que a adição de ácido húmico nas culturas resultou num aumento de 3 vezes na produção das enzimas LiP, MnP e lacase. Essa observação está de acordo com outros trabalhos, onde o ácido húmico aumentou a atividade das enzimas quando adicionados ao meio de cultivo de outros fungos de decomposição branca (WILLMANN & FAKOUSSA, 1997; DEHORTER & BLONDEU, 1992). A descoloração do sobrenadante de *P. cinnabarius* coincidiu com a produção de lacase. A adição de ácido húmico não apresentou efeito estimulatório ou inibitório no crescimento das linhagens.

Quanto a produção de proteína micelial, isto é, crescimento fúngico, verificou-se que a produção desta foi semelhante em ambos os casos de adição de ácido húmico (juntamente com o inóculo ou no 3º dia de crescimento).

Observou-se que houve produção de cit P-450 o qual variou de 0,00090 - 0,008 nmol mg<sup>-1</sup> proteína. Esta baixa quantidade detectada pode estar relacionada a dois fatores:

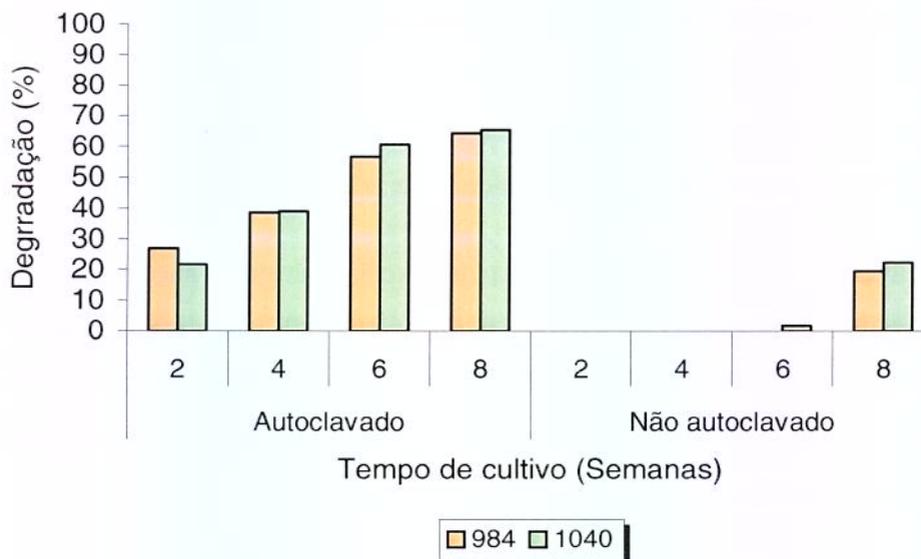
- 1- Dificuldades no processo de quebra do micélio fúngico, não liberando toda a proteína intracelular. Segundo o DOHNER & OESCH (1992) diversos métodos foram testados, sozinhos ou combinados, incluindo destruição mecânica, sonicação, homogenização com pilão, prensa e homogenização em moinho industrial. Somente uma pequena porcentagem da célula é destruída utilizando esses métodos.
- 2- Segundo MASAPHY, et. al., (1996) os estudos de cit P-450 fúngico é limitado devido a problemas em isolar a proteína ativa, pois ela facilmente é degradada para a forma de cit P-420.

## BIODEGRADAÇÃO DE HAPs NO SOLO

### 5.6. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR HAPs

Selecionou-se duas linhagens (*Aspergillus* sp - 984 e *Verticillium* sp - 1040), as quais apresentaram crescimento mais rápido em solos (estudos preliminares). Este estudo foi realizado em solo autoclavado e em solo não autoclavado (como descrito no item 4.16), para verificar se a microbiota do solo interfere na biodegradação dos HAPs. O solo utilizado foi classificado como arenoso.

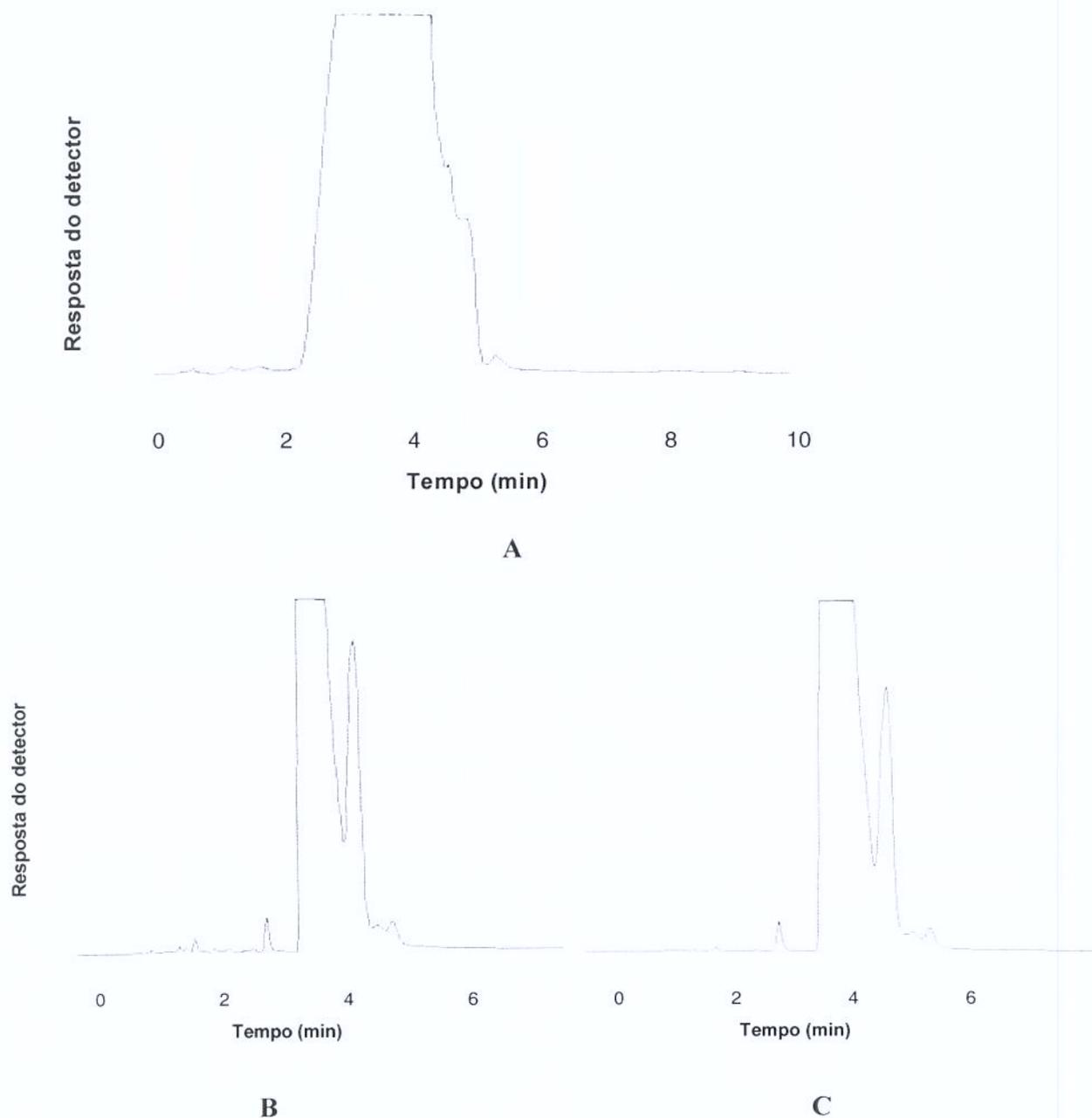
#### 5.6.1. Naftaleno



**FIGURA 74:** Degradação de naftaleno em solo autoclavado e não autoclavado.

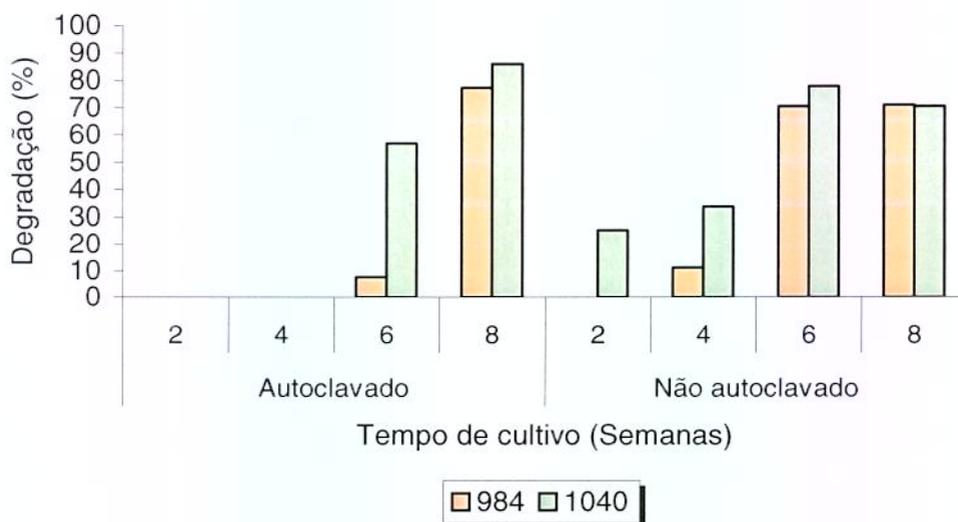
Como mostrado na Figura 74, após análise de degradação observou-se que as duas linhagens apresentaram melhor degradação do naftaleno quando o solo foi autoclavado, sendo que a melhor taxa de degradação foi com 8 semanas para as duas linhagens estudadas (Fig 75). Quando o solo não foi autoclavado praticamente não se detectou degradação deste composto, sugerindo que a microbiota do solo produziu efeito antagônico na degradação, para as duas

linhagens na presença deste composto, podendo ser devido ou a uma competição por nutrientes ou a presença de produtos que inibem o desenvolvimento dos microrganismos.



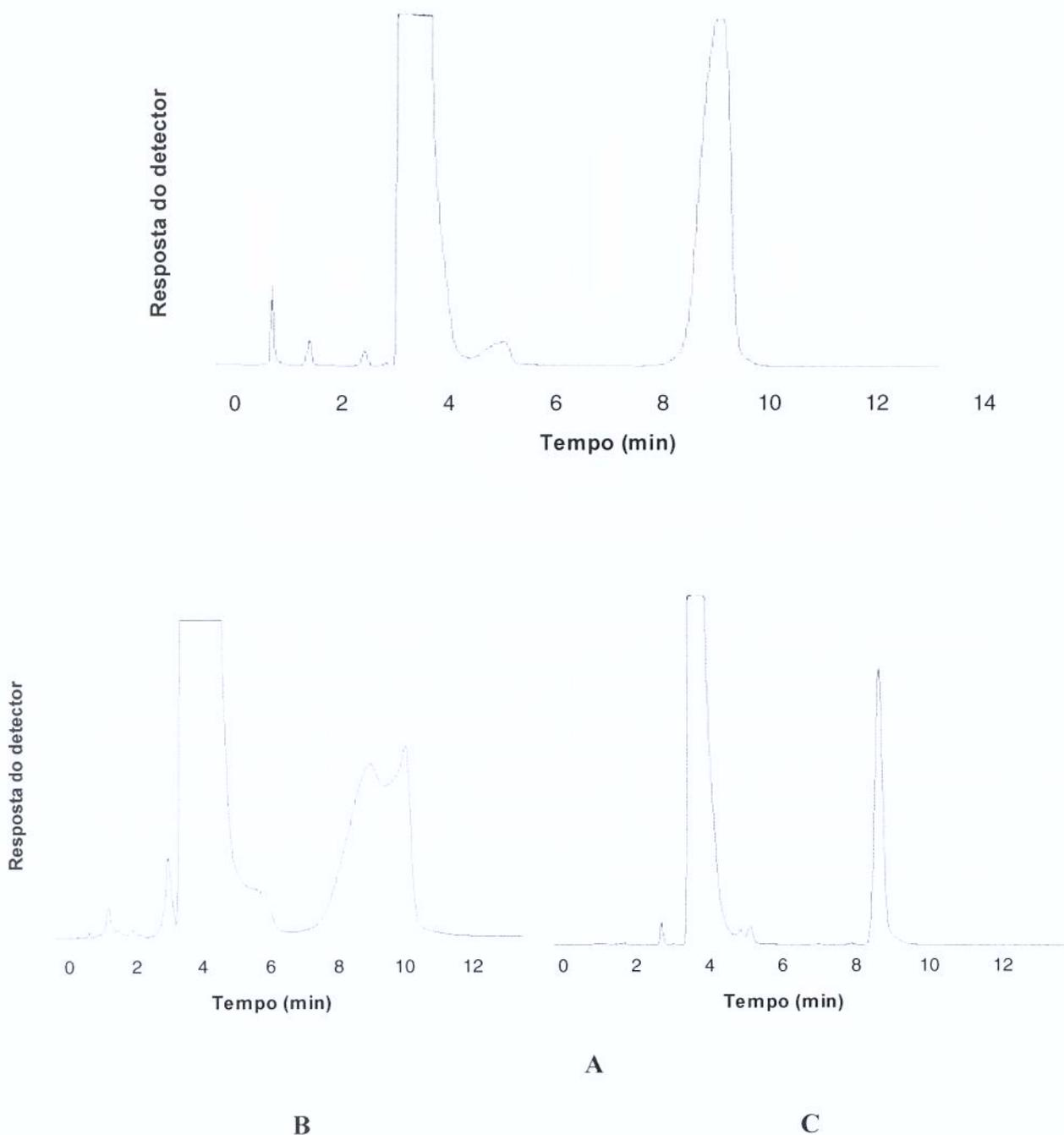
**FIGURA 75:** Cromatogramas das linhagens após 8 semanas de crescimento, utilizando naftaleno como substrato. A. Controle; B. *Aspergillus* sp (984); C. *Verticillium* sp (1040). Condições cromatográficas: Coluna ZORBAX C<sub>18</sub>; Fase móvel: acetonitrila/água (70:30); Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; Detecção: 254 nm.

### 5.6.2. Antraceno



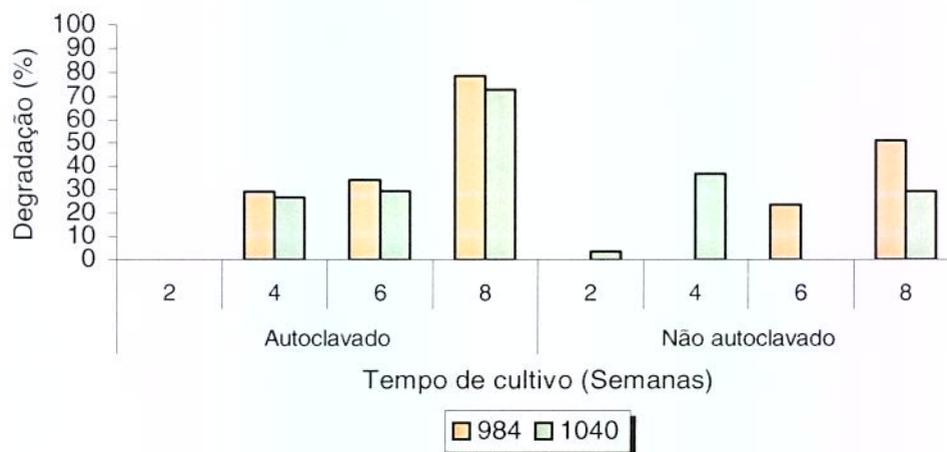
**FIGURA 76:** Degradação de antraceno em solo autoclavado e não autoclavado.

Quando antraceno foi utilizado como substrato (Fig 76), observou-se que não houve degradação nas quatro primeiras semanas, com solo autoclavado, mas na oitava semana as linhagens apresentaram uma degradação superior a 80% (Fig 77). Quando se utilizou solo não autoclavado houve degradação, sendo melhor nas duas últimas semanas (~70%), mas um pouco inferior ao solo autoclavado.



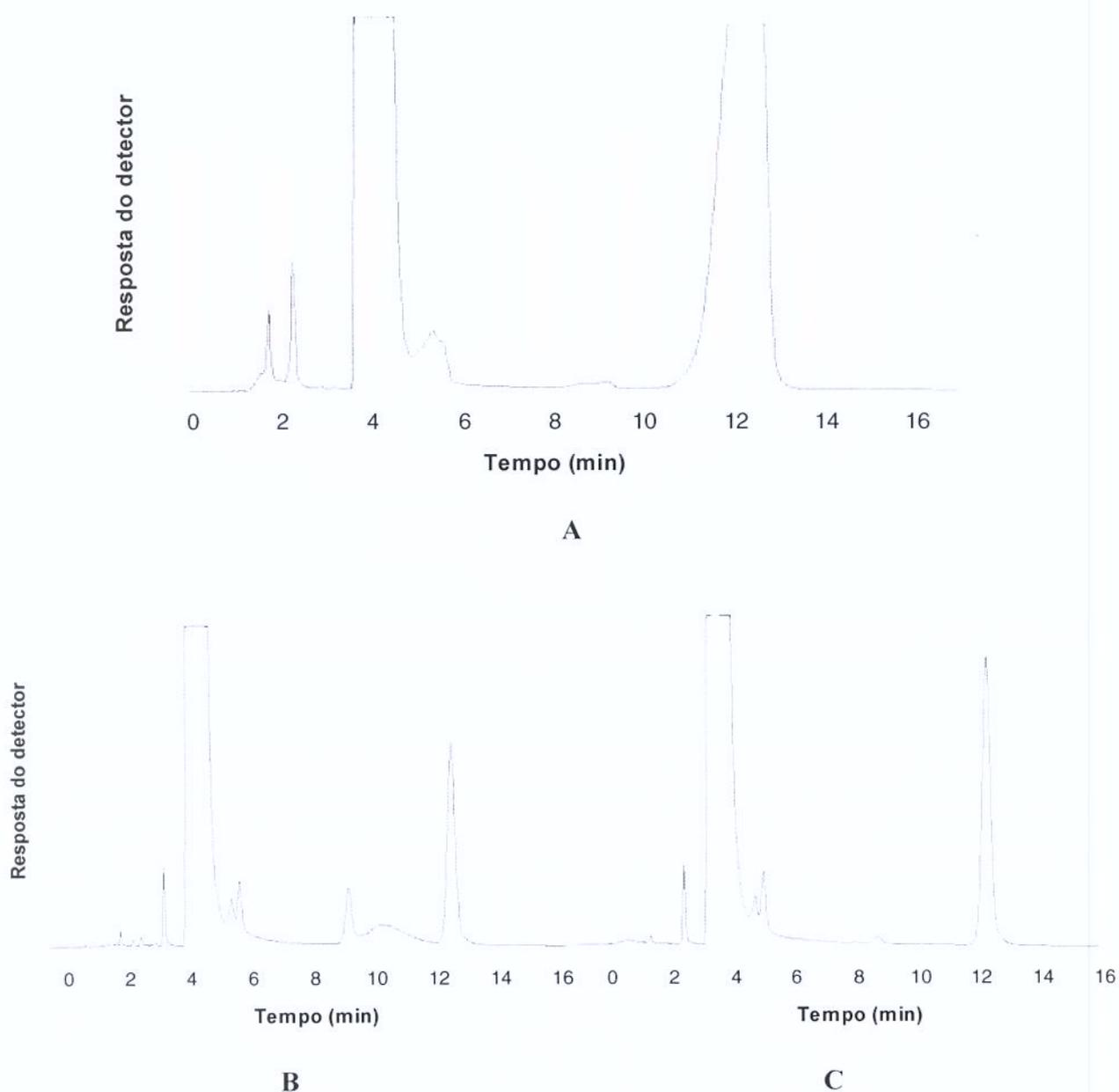
**FIGURA 77:** Cromatogramas das linhagens após 8 semanas de crescimento, utilizando antraceno como substrato. A. Controle; B. *Aspergillus* sp (984); C. *Verticillium* sp (1040). Condições cromatográficas: Coluna ZORBAX C<sub>18</sub>; Fase móvel: acetonitrila/água (70:30); Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; Detecção: 254 nm.

### 5.6.3. Pireno



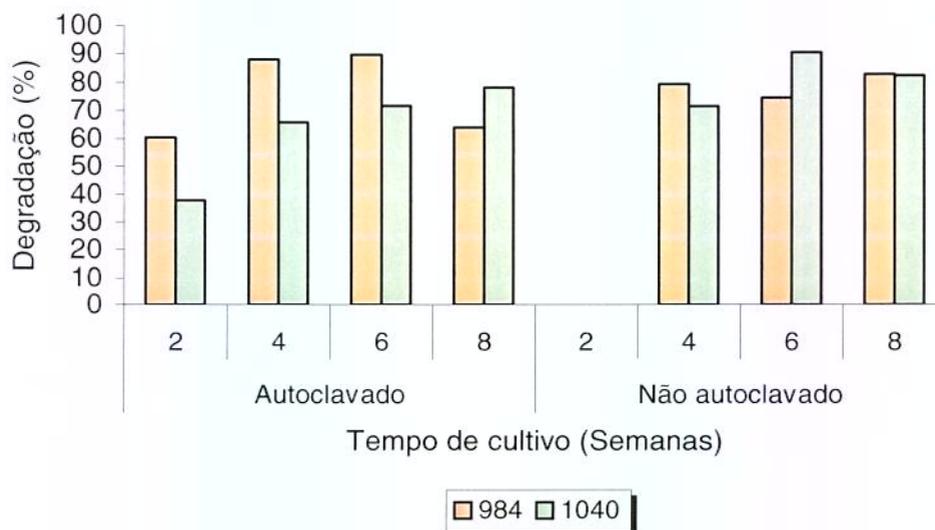
**FIGURA 78:** Degradação de pireno em solo autoclavado e não autoclavado.

Na presença de pireno (Fig 78) como contaminante observou-se que no solo autoclavado a porcentagem de degradação foi maior quando comparada com o solo não autoclavado, sendo que com oito semanas a degradação das duas linhagens foi superior a 70% (Fig 79). Enquanto que no solo não autoclavado a porcentagem máxima de degradação foi de 50%. Aqui parece também que a microbiota do solo teve um efeito negativo para as linhagens, produzindo uma diminuição na porcentagem de degradação deste composto.



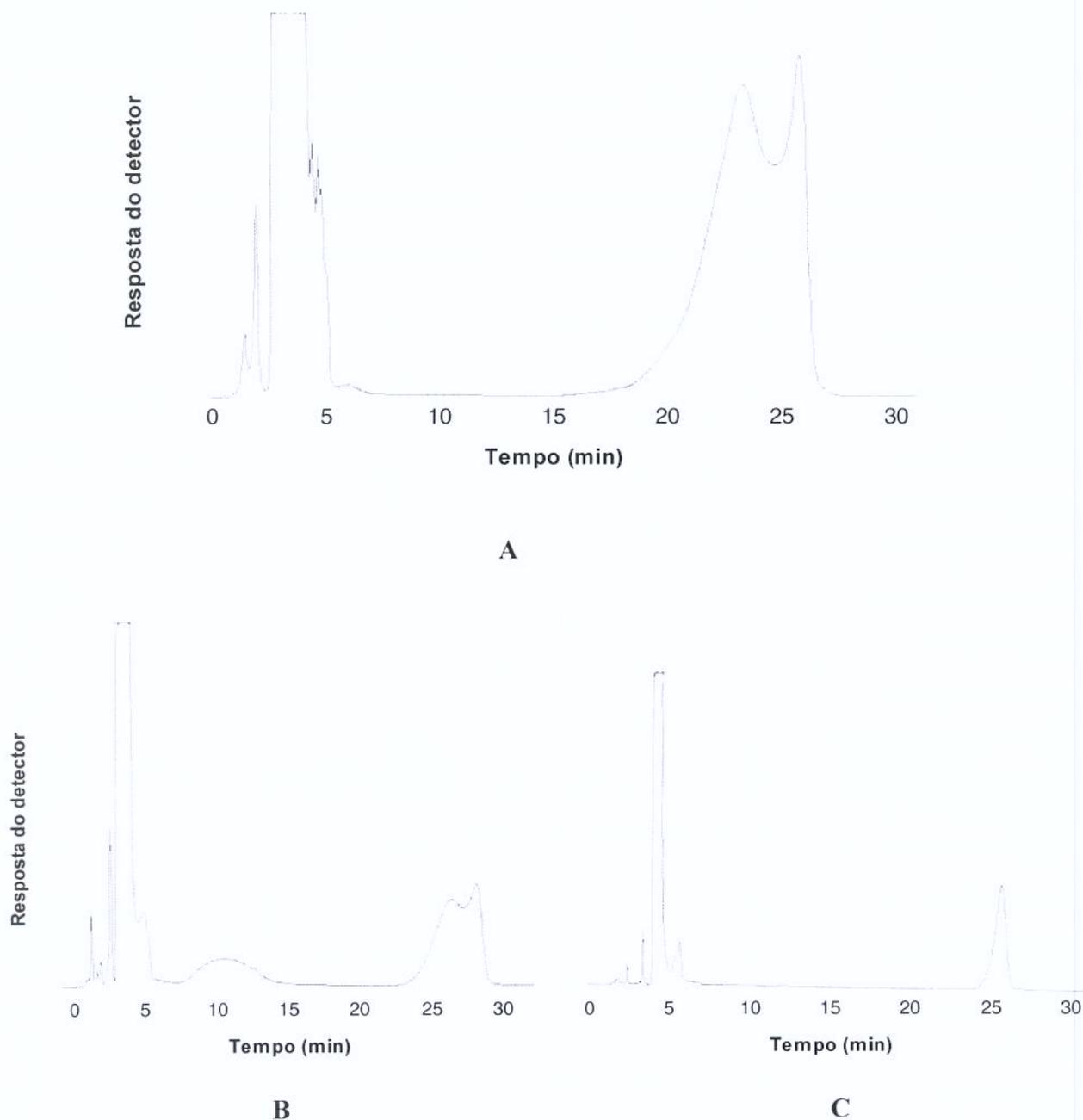
**FIGURA 79:** Cromatogramas das linhagens após 8 semanas de crescimento, utilizando pireno como substrato. A. Controle; B. *Aspergillus* sp (984); C. *Verticillium* sp (1040). Condições cromatográficas: Coluna ZORBAX C<sub>18</sub>; Fase móvel: acetonitrila/água (70:30); Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; Detecção: 254 nm.

#### 5.6.4. Benzo[a]pireno



**FIGURA 80:** Degradação de benzo[a]pireno em solo autoclavado e não autoclavado.

Quando utilizou-se o benzo[a]pireno, como contaminante, (Fig 80) não verificou diferenças significativas na degradação tanto com solo autoclavado como com solo não autoclavado. Sendo que para as duas condições, a porcentagem de degradação foi superior a 80% (Fig 81).



**FIGURA 81:** Cromatogramas das linhagens após 6 semanas de crescimento, utilizando benzo[a]pireno como substrato. A. Controle; B. *Aspergillus* sp (984); C. *Verticillium* sp (1040). Condições cromatográficas: Coluna ZORBAX C<sub>18</sub>; Fase móvel: acetonitrila/água (70:30); Vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; Detecção: 254 nm.

Os dados apresentados neste trabalho indicam que essas duas linhagens não basidiomicetos foram capazes de degradar os HAPs em solo, desde que apresentaram crescimento visível no solo autoclavado (nas quatro fontes de carbono) e também em solo não autoclavado (utilizando como fonte de carbono naftaleno e pireno). O crescimento das linhagens no solo autoclavado foi provavelmente estimulado pelo processo de autoclavagem de dois modos. 1) a morte efetiva da microbiota endógena, sendo fácil para os fungos inoculados competir e sobreviver neste solo; 2) a modificação das características físico/químicas no solo, levando a um aumento na concentração de nutrientes solúveis e matéria orgânica no solo (LYNCH, 1988).

ANDERSSON et al., (2000), observaram que para *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*, o aumento do crescimento visual parece estar relacionado com a degradação significativa dos HAPs. Já para *Hypholoma fasciculare*, apesar de ter apresentado crescimento visual, em ambos os solos autoclavado e não autoclavado, não houve degradação dos HAPs. O pouco crescimento visual e degradação no solo não autoclavado pode ser em parte explicado pela pouca habilidade dos fungos em competir com a microbiota do solo (MATENS & ZADRASIL, 1992; In der WIESCHE et al., 1996), ou as enzimas extracelulares não estarem sendo produzidas ou ativas.

CANET et al., (2001), demonstraram que a utilização de fungo de degradação branca para degradar HAPs no solo não foi considerada útil, talvez por causa da falta de aclimação dos fungos aos HAPs ou por causa da baixa temperatura utilizada (22°C).

Na biorremediação do solo, é importante uma completa degradação dos HAPs, seja pelo fungo inoculado ou em consórcio com a microbiota do solo. KOTTERMAN et al., (1998), utilizaram fungo de decomposição branca (*Bjerkandera* sp.), para degradar HAPs de alto peso molecular, como benzo[a]pireno. Após 15 dias de incubação eliminou-se 100% do composto, o qual foi adicionado ao meio de cultivo numa concentração inicial de 20 mg L<sup>-1</sup>. O resultado obtido neste trabalho está de acordo com o do autor acima, desde que as linhagens *Aspergillus* sp e *Verticillium* sp degradaram acima de 80% o benzo[a]pireno, após 4 semanas de cultivo, e a concentração utilizada foi superior a utilizada pelo autor referido.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

Os fungos analisados neste trabalho apresentaram grande capacidade de degradar os HAPs estudados, sendo que esta degradação variou dependendo da linhagem e das enzimas presentes.

Quando variou-se o tamanho do inóculo, observou-se que o tamanho deste adicionado ao meio de cultura apresentou um efeito antagônico na degradação dos HAPs influenciando a porcentagem de degradação dos compostos utilizados. Ao contrário do esperado, aumentando-se o tamanho do inóculo não houve aumento na porcentagem de degradação, produzindo um efeito negativo na biodegradação, exceto quando utilizou-se benzo[a]pireno como substrato.

Após o estudo da degradação dos HAPs, com a adição destes junto com o inóculo ou no 3º dia de crescimento, observou-se que as linhagens se comportaram de maneira diferente. A produção de enzimas ligninolíticas, biosurfactante, citocromo, proteína micelial e degradação também variaram. Verificou-se que os melhores resultados, para todas as quatro fontes de carbono utilizadas, foram quando da adição do composto no 3º dia de cultivo, isto porque o crescimento micelial conseguiu se estabilizar, para depois começar a utilizar os HAPs como fonte de carbono.

A melhor taxa de biodegradação de naftaleno foi obtida quando este foi adicionado ao meio no 3º dia de cultivo, e observou-se, para todas as linhagens, que tanto a enzima MnP como biosurfactante estiveram presentes.

Quando realizou-se o estudo da produção de cit P-450, utilizando-se naftaleno como fonte de carbono, não detectou-se esta proteína em nenhuma das cinco linhagens nos diferentes tratamentos.

Quando antraceno foi utilizado como substrato observou-se que a adição do composto no 3º dia também mostrou-se melhor para a degradação. A enzima MnP esteve presente, exceto para a linhagem 1040 que apresentou somente a lacase no seu melhor dia de degradação. Na presença deste substrato algumas linhagens além de apresentar MnP produziram também LiP, biosurfactante e citocromo, o que sugere que estejam também envolvidas com a degradação de antraceno.

Na presença de pireno, observou-se que nas duas condições de adição do composto as linhagens apresentaram comportamento semelhante quanto à porcentagem de degradação. As enzimas ligninolíticas, de uma forma geral, estiveram presentes nos melhores dias de degradação de cada linhagem, assim como também apresentaram a formação de biosurfactante e citocromo nestes melhores dias.

As linhagens apresentaram melhor porcentagem de degradação, quando o benzo[a]pireno foi utilizado como substrato, adicionado no 3º dia de crescimento. Verificou-se que as enzimas ligninolíticas estiveram presentes nestes dias como também algumas das linhagens apresentaram a produção de biosurfactantes e citocromo.

Após o estudo da concentração máxima de HAPs capaz de inibir o crescimento das linhagens, concluiu-se que quando se eleva muito a concentração dos substratos, estes inibem o crescimento. E os compostos com maior número de anéis aromáticos conseguem ter efeito inibitório em menor quantidade, enquanto que com os HAPs mais fáceis de serem degradados (naftaleno e antraceno) a concentração que causou inibição no crescimento foi bem maior.

No estudo da utilização do ácido húmico como surfactante observou-se que a degradação dos HAPs foi menor, quando comparada com estudos sem adição de ácido húmico, isto pode ser devido ao fato das linhagens primeiramente utilizarem o ácido húmico como substrato e não os HAPs, desde que as linhagens apresentaram descolorização do meio de cultivo.

Quando as linhagens foram cultivadas em solo contaminados por HAPs observou-se que as duas linhagens utilizadas rapidamente colonizaram o solo autoclavado e degradaram efetivamente os HAPs. Quando o solo não foi autoclavado, verificou-se que as linhagens colonizaram e degradaram os HAPs (em menor porcentagem), mas houve crescimento dos microrganismos endógenos, uma vez que observou-se visivelmente o crescimento de tais microrganismos com características diferentes das linhagens fúngicas utilizadas no trabalho.

Conclui-se que as linhagens são capazes de crescer e degradar tais HAPs, tanto em meio líquido como em meio sólido, mesmo os mais complexos como pireno e benzo[a]pireno, sendo que a porcentagem de degradação, a produção de enzimas ligninolíticas, citocromo P-450 e biosurfactante, produção de proteína micelial variaram de acordo com a linhagem e com a fonte de carbono utilizada.

A análise das estruturas macroscópicas e microscópicas das linhagens fúngicas (710, 870, 898, 984 e 1040) indicaram que pertencem aos seguintes gêneros: *Acremonium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Verticillium*, respectivamente.

Os resultados aqui apresentados indicam que as linhagens utilizadas neste trabalho tem um grande potencial para degradação de HAPs e também para aplicação em processos de bioremediação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L. & MacCARTHY, P. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L. & MacCARTHY, P. (Eds), Humic substances in soil, sediment and water, geochemistry, isolation and characterization. Wiley, new York, p. 1-12, 1985.
- ANDELMAN, J. B. & SUESS, M. J. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. Bull World Health Organization. v. 43, p. 479-508, 1970.
- ANDER, P. HATAKKA, A. & ERIKSSON, K. E. Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* Arch. Microbiol. v. 125, p.. 189-202, 1980
- ANDERSON, B. E. & HENRYSSON, T. Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 46, p. 647-652, 1996.
- ANDERSSON, B. E.; WELINDER, L.; OLSSON, P. A.; OLSSON, S. & HENRYSSON, T. Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. Biores. Technol. v. 73, p. 29-36, 2000.
- ARONSTEIN, B. N.; CALVILLO, Y.M. & ALEXANDER, M. Effects of surfactants at low concentration on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. Environ. Sci. Technol. v. 25, p. 1728-1731, 1991.
- ASADA, Y., MIYABE, M., KIKKAWA, M. & KUWAHARA, M. Oxidation of NADH by a peroxidase of a lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, and its involvement in the degradation of a lignin model compound Agric. Biol. Chem. v. 50, p. 525-529, 1986
- ASPERGER, O.; STEINBRENNER, H.; LEHMANN, A.; PETSCH, M. & GRIENGL, H. Induction and functional role of cytochromes P450 in the filamentous fungi *Mortierella apina* ATCC 8979 and *Cunninghamella blakesleeana* DSM 1906 during hydroxylation of cycloalkylbenzoxazoles. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 51, p. 516-522, 1999.

- ASPERGER, O.; WIRKNER, K.; SCHMIDT, M. & FLECHSIG, E. Detection of diverse cytochrome P450-dependent biooxygenation catalysts in microorganisms using a multipurpose inducer. Biocatalysis. v. 10, p. 233-246, 1994.
- ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation-Bioremediation of oil spills J. Chem. Technol. Biotechnol v. 52, p. 149-156, 1991
- AUST, S. D. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium* Microbiol. Ecol. v. 20, p. 197-209, 1990
- BAI, G. Y.; BRUSSEAU, M. L. & MILLER, R. M. Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbons from soil. J. Cont. Hydrol. v. 25, p. 151-170, 1997.
- BAL-TEC Preparation technology for electron microscopy – Catalogue N.5 A-Systems and devices. Liechtenstein: Bal-Tec AG, 1999.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S. & CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARCLAY, C. D., FARQUHAR, G. F. & LEGGE, R. L. Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 42, p. 958-963, 1995
- BARTLE, K. D. Analysis and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. In: COLIN, C., PURCHASE, R. (Ed.) Food contaminants: Sources and surveillance chapter 3, p. 41-60, 1991.
- BERNHARDT, R. Cytochrome P450: Structure, function and generation of reactive oxygen species. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. v. 127, p. 137-221, 1995.
- BERTRAND, G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans suc de quelques champignons C.R. Hebd Seances Acad Sci. v. 123, p. 463-465, 1896
- BEZALEL, L.; HADAR, Y. & CERNIGLIA, C. E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. v. 62, p. 292-295, 1996.
- BLONDEU, R. Biodegradation of natural and synthetic humic acids by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* Appl. Environ. Microbiol. v. 55(5), p. 1282-1285, 1989

- BOGAN, B. W. & LAMAR, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading of *Phanerochaete chrysosporium* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes Appl. Environ. Microbiol. v. 62(5), p. 1597-1603, 1996
- BOLLAG, J. -M., SHUTTLEWORTH, K. L. & ANDERSON, D. H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds Appl. Environ. Microbiol. v. 54, p. 3086-3091, 1988
- BONO, J.J., GOULAS, P., BOE, J.F., PORTET, N. & SERIS, J.L. Effect of Mn (II) on reactions catalyzed by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Eua. J. Biochem. v. 192, p. 189-193, 1990
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L. & STANLEY, G. A. degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. v. 66 (3), p. 1007-1019, 2000.
- BOYLE, D.; WIESNER, C. & RICHARDSON, A. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. Soil Biol. Biochem. v. 30, p. 873-882, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. v. 72, p. 246-254, 1976.
- BRAUN, S. & VECHT-LIFSHITZ, S. E. Mycelial morphology and metabolite production. TIBTECH v. 9, p. 63-68, 1991.
- BUDZINSKI, H.; JONES, I.; BELLOCQ, J.;PIÉRARD, C. & GARRIGUES, P. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. Marine Chem. v. 58, p. 85-97, 1997.
- BUMPUS, J. A. & AUST, S. D. Biodegradation of environmental pollutants by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system Bio Essays v. 6, p. 166-170, 1987
- BUMPUS, J. A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* Appl. Environ. Microbiol. vol 55, p. 154-158, 1989
- BUMPUS, J. A., TIEN, M., WRIGTH, D. & AUST, S. D. Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot-fungus Science v. 228, p. 1434-1436, 1985
- BUSWELL, J. A. & ODIER, E. Lignin biodegradation CRC Crit. Rev. Biotechnol. v. 6, p.1-60, 1987

- CALL, H. P. & MÜCKE, I. History overview and applications of mediated ligninolytic systems especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). J. Biotechnol. v. 53, p. 63-, 1997.
- CAMARGO, M. C. R. Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da dieta. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2000, 267 p (tese de Doutorado).
- CAMARGO, M. S. F. O. & TOLEDO, M. C. F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, cremes vegetais e maionese. Ciênc. Tecnol. Alimentos. v. 20 (1), p. 51-55, 2000.
- CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S. & AUST, S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 54, p. 751-758, 2000.
- CANET, R.; BIRRNSTINGL, J. G.; MALCOM, D. G.; REAL-LOPEZ, J. M. & BECK, A. J. biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of White-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. Biores. Technol. v. 76, p. 113-117, 2001.
- CAVALIERI, E. I. & ROGAN, E. G. Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis. Environ. Health Perspect. v. 64, p. 69-84, 1985.
- CERNIGLIA, C. E. & CROW, S. A. Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeast Arch. Microbiol. v. 129, p. 9-13, 1981
- CERNIGLIA, C. E. & HEITKAMP, M. A. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment In: Varanasi U ed Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment p. 41-68, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989
- CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons In: Laskin A ed. Advances in Applied Microbiology v. 30, p. 31-71, Academic Press, New York, 1984
- CERNIGLIA, C. E., SUTHERLAND, J. B. & CROW, S. A. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons In: Winkelmann G ed Microbial Degradation of Natural Products p. 193-217, VCH Press, Weinheim, 1992
- CERNIGLIA, C. E.; WHITE, G. L. & HEFLICH, R. H. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch. Microbiol. v. 143, p. 105-110, 1985.

- CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradaton. v. 3, p. 351-368, 1992.
- CHAPMAN, P. J. Degradation mechanisms In: Bourquin AW & Pritchard PH ed Proceedings of the workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments p. 28-66, U.S. Environment Protection Agency, Gulf Breeze, FL, 1979
- CHEVALIER, T.; de RIGAL, D.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F. & FILS-LYCAON, B. R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. Plant. Physiol. v. 119, p. 1261-, 1999.
- CHIVUKULA, M. & RENGANATHAN, V. Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. v. 61, p. 4374-4377 1995.
- CLEMENTE, A. R. Seleção de microrganismos ligninolíticos, estudo do sistema enzimático produzido e sua relação na degradação de compostos xenobióticos Lorena Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL)/Departamento de Biotecnologia (DEBIQ), 1997 137 p (Tese de Mestrado)
- CLEMENTE, A. R.; ANAZAWA, A. & DURRANT, L. R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. Braz. J. Microbiol. v. 32, p. 255-261, 2001.
- COATES, J. T.; ELZERMAN, A. T. & GARRISON, A. W. Extraction and determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in plant tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. v. 69 (1), p. 110-114, 1986.
- COHEN, M. & GABRIELE, P. D. Degradation of coal by the fungi *poliporus versicolor* and *Poria monticola*. Appl. Environ. Microbiol. v. 44, p. 23-27, 1982.
- COLBY, J.; SSTIRLING, D. I. & DALTON, H. The soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): its ability to oxygenate *n*-alkanes, *n*-alkenes, ethers and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds Biochem. J. v. 165, p. 3995-402, 1977
- COLBY, J.; SSTIRLING, D. I. & DALTON, H. Resolution of the methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) into three components. Purification and properties of component C, a flavoprotein Biochem. J. v. 171, p. 461-468, 1978
- COOPER, D. & GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. v. 53, p. 224-229, 1987.

- DALTON, H., GOLDING, B. T., WATERS, B. W., HIGGINS, R. e & TAYLOR, J. A. Oxidations of cyclopropane, methylcyclopropane, and arenes with the mono-oxygenase system from *Methylococcus capsulatus* J. Chem. Soc. Chem. Commun. v. 1981, p. 482-483, 1981
- DAUDABARAS, D. & CHAKRABARTY, A. M. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. Biodegradation v. 3, p. 125-135, 1992
- DEHORTER, B. & BLONDEU, R. Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* FEMS Microbiol. Lett. V. 94, p. 209-216, 1992
- DESAI, J. D. & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Rev. v. 61, p. 47-67, 1997.
- DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CABRAL, J. M. S. & FONSECA, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzym. Microbiol. Technol. v. 26, p. 394-401, 2000.
- DUTTA, D.; GHOSH, D. K.; MISHRA, A. K. & SAMANTA, T. B. Induction of a benzo[a]pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Evidence for multiple forms of cytochrome P450. Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 115 (2), p. 692-699, 1983.
- ERIKSSON, K. -E. & NISHIDA, A. Methanol oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* Methods Enzymol. v. 161B, p. 322-326, 1988
- ERIKSSON, K. E. Biotechnology in the pulp and paper industry Wood Sci. Technol. v. 24, p. 79-101, 1990
- ERIKSSON, K. E., JOHNSRUD, S. C. & VALLANDER, L. Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* Arch. Microbiol. v. 135, p. 161-168, 1983
- EVANS, C. S., DUTTON, M. V. GUILLÉN, F. & VENESS, R. G. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation FEMS Microbiol. Rev. v. 13, p. 235-240, 1994
- EVANS, C. W. & FUCHS, G. Anaerobic degradation of aromatic compounds Ann. Rev. Microbiol. v. 42, p. 289-317, 1988

- FIELD, J. A., DE JONG, E., COSTA, G. F. & DE BONT, J. A. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot-fungi Appl. Environ. Microbiol. v. 58, p. 2219-2226, 1992
- FIELD, J.A., DE JONG, E., FEIJOO-COSTA G., & DE BONT, J.A.M, Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Elsev. Scienc. Publish. Ltda (UIQ) v. 11, p. 44-48, 1993.
- FREEMAN, D. J. & CATELL, F. C. R. Wood burning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. v. 24, p. 1581-1585, 1990.
- GANESHALINGAM, S.; LEGGE, R. L. & ANDERSON, A. A. Surfactant enhanced leaching of polyaromatic hydrocarbons from soil. Trans Inst. Chem. Eng. v. 72, p. 247-251, 1994.
- GERIN, P. A.; DUFRENE, Y.; BELLON-FONTAINE, M. N.; ASTER, M. & ROUXHET, P. G. Surface properties of the conidiospores of *Phanerochaete chrysosporium* and their relevance to pellet formation. J. Bacteriol v. 175, p. 5135-5144, 1993.
- GIBSON, D. T. & SUBRAMANIAN, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons In Gibson DT ed Microbial Degradation of Organic Compounds p. 181-252, Marcel Dekker, New York, 1984
- GLENN, J. K., AKILESWARAN, L. & GOLD, M. H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Arch Biochem. Biophys v. 251. p. 688-696, 1986
- GLENN, J. K., MORGAN, M. A., MAYFIELD, M. B., KUWAHARA, M. & GOLD, M.H. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in the lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Biochem. Biophys Res. Commun. v. 114, p. 1077-1083, 1983
- GLENN, J.K. & GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. v. 242 p. 329-341, 1985.
- GOLD, M. H. & ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Microbiol Rev. v. 57 (3), p.606-622, 1993

- GOLD, M. H., WARIISHI, H. & VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* ACS Symp. Ser. v. 389, p. 127-140, 1989
- GONZALEZ, F. J. Molecular genetics of the P-450 superfamily. Pharmacol. Ther. v. 45, p. 1-38, 1990
- GRASSO, P. Carcinogens in food. In: Chemical Carcinogens. v. 2, 2<sup>nd</sup> ed., edited by Charles E. SEARLE, ACS Monographs, American Chemical Society, Washington, DC, p. 1205-1239, 1984.
- GRBIC-GALIC, D. & VOGEL, T. M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures Appl. Environ. Microbiol. v. 53, p. 254-260, 1987
- GREENBERG, A.; CHE-HAN, H.; ROTHMAN, N. & STRICKLAND, P. T. PAH profiles of charbroiled hamburgers: pyrene/B[a]P ratios and presence of reactive PAH. Polycyclic aromatic compounds. v. 3 (2), p. 101-110, 1993.
- GREENE, R. V. & GOULD, J. M. Fatty acyl-caenzyme A oxidase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 118, p. 437-443, 1984
- GUENGERICH, F. P. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. J. Biol. Chem. v. 266, p. 10019-10022, 1991.
- GUERIN, W. F. & BOYD, S. A. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species Appl. Environ. Microbiol. v. 58, p. 1142-1152, 1992
- GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, A. T. & MARTÍNEZ, M. J. Substrate specificity and properties of the aryl-cohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eringii* Eur. J. Biochem. v. 209, p. 603-611, 1992
- HÄGGBLOOM, M. M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds FEMS Microbiol. Rev. v. 103, p. 29-72, 1992
- HARAYAMA, S. & KOK, M. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. v. 46, p. 565-601, 1992.
- HARAYAMA, S. Poly aromatic hydrocarbons bioremediation design. Curr. Opin. Biotechnol. v. 8, p. 268-273, 1997.

- HARVEY, S.; ELASHVILLI, I.; VALDES, J. J.; KAMELY, D. & CHAKRABARTY, A. M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. Biotechnonology. v. 8, p. 228-230, 1990.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol. Rev., v. 13, p. 125-135 1994
- HAYES, M. H. B.; MacCARTHY, P.; MALCOLM, R. L. & SWIFT, R. S. In: HAYES, M. H. B.; MacCARTHY, P.; MALCOLM, R. L. & SWIFT, R. S. (Eds). Humic Substances II: Search of structure. Wiley, Chichester, p. 689-733, 1989.
- HIGSON, F. K. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. Ver. Environ.Contamin. Toxicol. v. 122, p. 111-152, 1991.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry and biodegradation. Wood Sci. Technol. v. 24, p. 23-63, 1990
- HITES, R. A., LaFLAMME, R. E. & FARRINGTON, J. W. Sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons: the historical record Science v. 198, p. 829-831, 1977
- HOFMANN, H.; JENZ, S.; SEIDEL, H. & STOTTMESTER, U. Transformation of 9-methylanthracene with isolated soil fungi. 4<sup>th</sup> Annual Groundwater and Soil Remediation. Calgary, Alberta, p. 699-710, 1994.
- HOFRICHTER, M.; VARES, K.; SCHEIBNER, K.; GALKIN, S.; SIPILA, J. & HATAKKA, A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. J. Biotechnol. v. 67, p. 217-228, 1999.
- HOWARD, J. W. & FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. J. Association of Official Analytical Chem. v. 63 (5), p. 1077-1104, 1980.
- IARC. Internacional Agency for Research on cancer. Polynuclear aromatic compounds. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. v. 32, Lyon, France, 1983.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Polynuclear aromatic compounds. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. Part 4, Bitumens, Coal-tars and derived products. v. 35, Lyon, France, 1985.
- IN DER WIESCHE, C.; MARTENS, R. & ZADRAZIL, F. Two-step degradation of pyrene by white-rot fungi and soil microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 46, p. 653-659, 1996.

- INBAR, Y.; CHEN, Y. & HADAR, Y. Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. *Soil Sci. Am. J.* v. 53, p. 1695-1701, 1989.
- JACOB, J., KARCHER, W., BELLIARDO, J. J. & WAGSTAFFE, P. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance *Fresenius, Z. Anal. Chem.* v. 323, p. 1-10, 1986
- JIMÉNEZ-TOBON, G. A.; PENNINGKX, J. & LEJEUNE, R. The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. *Enzym. Microbiol. Technol.* v. 21, p. 537-542, 1997.
- JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. & HÜTTERMANN, A. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 46, p. 313-317, 1996.
- JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V. & YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* v. 6, p. 487-490, 1992.
- JOVILET, S.; AIRPIN, N.; WICHERS, H. J. & PELLON, G. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* v. 102, p. 1459-1483, 1998.
- KANGA, S. A.; BONNER, J. S.; PAGE, C. A.; MILLS, M. A. & AUTENRIETH, R. L. Solubilization of naphthalene and methyl-substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. *Environ. Sci. Technol.* v. 31, p. 556-561, 1997.
- KARAM, J. & NICELL, J. A. potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v. 69, p. 141-147, 1997.
- KATAGIRI, N.; TSUTSUMI, Y. & NISHIDA, T. Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of Kraft pulp by White rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 61, p. 617-622, 1995.
- KELLEY, R. L. & REDDY, C. A. Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* *J. Bacteriol.* v. 166, p. 269-274, 1988
- KIEHLMANN, E.; PINTO, L. & MOORE, M. The transformation of chrysene to trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene by filamentous fungi. *Can. J. Microbiol.* v. 42, p. 604-608, 1996.

- KIRK, T. K. & FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin Annu. Ver. Microbiol. v. 41, p. 465-505, 1987
- KONTCHOU, C. Y., BECHET, M. & BLONDEU, R. Catabolic activity on humic acids of *Streptomyces viridosporus* grow under oxygen Can. J. Microbiol. v. 39, p. 987-989, 1993
- KOTTERMAN, M. J. J.; VIS, E. H. & FIELD, J. A. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and indigenous microflora. Appl. Environ. Microbiol. v. 64, p. 2853-2858, 1998.
- KRIVOBOK, S.; MIRIOUCHKINE, E.; SEIGLE-MURANDI, F. & BENOIT-GUYOD, J-L. Biodegradation of anthracene by soil fungi. Chemosphere. v. 37, p. 523-530, 1998.
- KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M. A. & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidizes from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* FEBS Lett. v. 169, p. 247-250, 1984.
- LABORDE, J. Sur la casse des vins C.R. Hebd Seances Acad Sci. v. 123, p. 1074-1075, 1896
- LACKNER, R.; SREBOTNIK, E. & MESSNER, K. Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Pharechaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 178, p. 1092-1098, 1991
- LARSSON, B. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods – Aspects on analysis, occurrence and intake. Doctoral thesis. Swedish University of Agriculture Science, 1986.
- LARSSON, B. K.; REGNÉR, S. & BAELING, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile N-nitrosamine content of wheat grain before and after gas-fired drying. J. Sci. Food Agricul. v. 56, p. 373-384, 1991.
- LAUNEN, L.; PINTO, L.; WIEBE, C.; KIEHLMANN, E. & MOORE, M. The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. Can. J. Microbiol. v. 41, p. 477-488, 1995.
- LEONOWICZ, A., SZKLARZ, G. & WOJTAS-WASILEWSKA, M. The effect of fungal laccase on fractionated liginosulphonates (Peritan Na) Phytochem. v. 24, p. 393-396, 1985
- LESAGE, S.; WAN-CHI, L.; MILLAR, K.; LIU, D.; HOFMANN, H. & SEIDEL, H. Effect of humic acid on the biodegradation of PAHs by bacteria and fungi. In Situ and On Site Bioremediation. v. 2, p.185-191, 1997.

- LESAGE, S.; XU, H.; NAVAKOWSHI, K. S.; BROWN, S. & DURHAM, L. Use of humic acids to enhance the removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers Part II: Pilot scale. 5<sup>th</sup> Annual Groundwater and Soil Remediation. Toronto, Ontario. Proceedings on CD-ROM, 10 p, 1995.
- LIND, T.; SIEGBAHN, P. E. M. & CRABTREE, R. H. A quantum chemical study of the mechanism of tyrosine. J. Phys. Chem. v. 103, p. 1193-, 1999.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment J. Chem. Tech. Biotechnol. v. 57, p. 195-211, 1993
- LO, M. & SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. Res Rev v. 69, p. 35-36, 1978.
- LYNCH, J. M. Microorganisms in their natural environments – the terrestrial environment. In: Lynch, J. M., Hobbie, J. E. (Eds), Micro-organisms in action: Concepts and applications in microbial ecology. Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, p. 103-131, 1988.
- MANILAL, V. B. & ALEXANDER, M. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil App: Microbiol. Biotechnol. v. 35, p. 401-405, 1991
- MARTENS, R. & ZADRAZIL, F. Screening of white-rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: Preprints from the international symposium on soil decontamination using biological processes. DECHEMA, Frankfurt am Main, p. 505-510, 1992.
- MARZULLO, L., CANNIO, R., GIADINA, P., SANTINI, M. T. & SANNIA, G. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates J. Biol. Chem. v. 270, p. 3823-3827, 1995
- MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HENIS, Y.; VENKATESWARLU, K. & KELLY, S. L. Microsomal and cytosolic cytochrome P-450 mediated benzo[a]pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonaris*. Biotechnol. Lett. v. 17, p. 969-974, 1995.
- MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HENIS, Y.; VENKATESWARLU, K. & KELLY, S. L. Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo[a]pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. v. 135, p. 51-55, 1996.

- MASAPHY, S.; LAMB, D. C. & KELLY, S. L. Purification and characterization of a benzo[a]pyrene hydrolase from *Pleurotus pulmonaris*. Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 266, p. 326-329, 1999.
- McGUIRL, M. A. & DOOLEY, D. M. Copper-containing oxidases. Curr. Opin. Chem. Biol. v. 3, p. 138-144, 1999.
- MEANS, J. C., WARD, S. G., HASSET, J. J. & BANWART, W. L. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by sediments and soils Environ. Sci. Technol. v. 14, p. 1524-1528, 1980
- MERSCH-SUNDERMANN, V.; ROSENKRANZ, H. R. & KLOPMAN, G. Structural basis of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutagenesis. v. 7, p. 211-218, 1992.
- MESSNER, R. & KUBICEK, C. P. Carbon source of cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. v. 57, p. 630-635, 1991.
- METZ, B. & KOSSEN N. W. Biotechnology review: The growth of molds in the form of pellets: A literature review. Biotechnol. Bioeng. v. 19, p. 781-799, 1997.
- MILLER, E. C. & MILLER, J. A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules Cancer v. 47, p. 2327-2345, 1981
- MILLER, R. M. & BARTHA, R. Evidence of liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes Appl. Environ. Microbiol. v. 55, p. 269-274, 1989
- MILLER, R. M. biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. Environ. Health Perspect. v. 103, p. 59-62, 1995.
- MITARD, A. & RIBA, J. B. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. Biotechnol. Bioeng. v. 32, p. 835-840, 1988.
- MUELLER, J. G., CHAPMAN, P. J., BLATTMANN, B. O. & PRITCHARD, P. H. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis* Appl. Environ. Microbiol. v. 56, p. 1079-1086, 1990
- MÜLLER, R. Bacterial degradation of xenobiotics In Microbiol Control of Pollution eds J. C. Fry, G. M. Gadd, R. A. Herbert, C. W. Jones & I. A. Watson-Craik Symposium n<sup>o</sup> 48, Society for General Microbiology, Cambridge University Press, p. 35-7, 1992

- MULLER-HURTING, R.; WAGNER, F.; BLASZCZYK, R. & KOSARIC, N. Biosurfactants for environmental control. In: Kosaric N (ed) Biosurfactants – production, properties and applications. Surfactants science. v. 48, Dekker, New York, p. 447-469, 1993.
- MÜNCNEROVÁ, D. & AUGUSTIN, J. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: A Review Biores. Technol. v. 48, p. 97-106, 1994
- NEBERT, D. W. & GONZALEZ, F. J. P450 genes: structure, evolution and regulation. Annu. Rev. Biochem. v. 56, p. 945-993, 1987.
- NEBERT, D. W.; NELSON, D. R.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W. & FEYEREISEN, R. The P450 superfamily update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. DNA Cell. Biol. v. 10, p. 1-14, 1991.
- NEILSON, A. H. The biodegradation of halogenated organic compounds Arch. Microbiol. v. 154, p. 23-30, 1990
- NOLL, I. B. & TOLEDO, M. C. F. Benzo[a]pireno em carnes defumadas pelos processos caseiro e industrial. Rev. Brasil. Toxicol. v. 10 (1), p. 19-23, 1997.
- NOVOTNY, F. J.; EISCHEN, J. M. & RICE, J. A. Applicability of fast-atom bombardment mass spectrometry to the characterization of fúlvico acid. Anal. Chimia Acta. v. 392, p. 319-332, 1999.
- NOVOTNÝ, C.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML,.; ROTHSCHILD, .; DOSORETZ, C. & SASEK, V. *Irpex lacteus*, a White rot fungus applicable to water and soil bioremediation. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 54, p. 850-853, 2000.
- OHKUMA, M.; TANIMOTO, T.; YANO, K. & TAKAGI, M. CYP52 (cytochrome P450<sub>alk</sub>) multigene family in *Candida maltosa*: molecular cloning and nucleotide sequence of the two tandemly arranged genes. DNA Cell. Bio. v. 10, p. 271-282, 1991.
- OMURA, T. Forty years of cytochrome P450. Biochem. Biophys. Res. Comm. v. 266, p. 690-698, 1999.
- OMURA, T. & SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemo-protein nature. J. Biol. Chem. v. 239, p. 2370-2378, 1964.

- PAICE, M.G.; REID, I. D.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S. & JURASEK, L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp. Appl. Environ. Microbiol., v. 59, p. 260-265, 1993
- PASZCZYNSKI, A.; HUYNH, V.B. & CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett., v. 29, p. 37-41, 1985.
- PEREZ, J. & JEFFRIES, T.W. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., v. 58, p. 2402-2409, 1992
- PICKARD, M. A.; ROMAN, R.; TINOCO, R. & VAZQUEZ-DUHALT, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. Appl. Environ. Microbiol. v. 65, p. 3805-3809, 1999.
- PORTER, T. D. & COON, M. J. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. J. Biol. Chem. v. 266, p. 13469-13472, 1991.
- RAVELET, C.; GROSSET, C. KRIVOBOK, S.; MONTUELLE, B. & ALARY, J. Pyrene degradation by two fungi in a freshwater sediment and evaluation of fungal biomass by ergosterol content. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 56, p. 803-808, 2001.
- RAVELET, C.; KRIVOBOK, S.; SAGE, L. & STEIMA, R. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. Chemosphere. v. 40, p. 557-563, 2000.
- REDDY, C. A. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* J. Biotechnol. v. 30, p. 91-107, 1993
- REDDY, C.A & D' SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Rev., v. 13, p. 137-152, 1994
- REINEKE, W. & KNACKMUSS, H. J. Microbial degradation of haloaromatics Ann. Rev. Microbiol. v. 42, p. 263-287, 1988
- RENGANATHAN, V. & GOLD, M. H. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Biochem. v. 25, p. 1626-1631, 1986

- RIDDEL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycol. v. 42, p. 265-270, 1950.
- RINGLING, D. & VAN ALFEN, N. K. Extra- and Intracellular laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica* Appl. Environ. Microbiol. v. 59, p. 3634-3639, 1993
- ROE, F. J. C. Sixty years after the discovery of pure carcinogens of the polycyclic aromatic class: a tribute to the contributions of Sir Ernest Kennaway to cancer epidemiology and fundamental research in the field of carcinogenesis. J. Occupat. Med. v. 35, p. 9-11, 1993.
- ROUSE, J. D.; DABATINI, D. A.; SUFLITA, J. M. & HARVELL, J. H. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. A critical review. Environ. Sci. Technol. v. 24, p. 325-370, 1994.
- SCHIPPERS, C.; GESSNER, K.; MÜLLER, T. & SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. J. Biotechnol. v. 83, p. 189-198, 2000.
- SCHULTEN, H. R. & PLAGE, B. A chemical structure for humic substances Naturwissenschaften v. 78, p. 311-312, 1992
- SCOTT, G. & GILEAD, D. Degradable polymers. London: Chapman & Hall, 1995.
- SHELTON, J. C., KHADER, S., KARNS, J. S. & POGELL, B. M. Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces* Biodegradation v. 7, p. 129-136, 1996.
- SHIELDS, P. G. Inherited factors and environmental exposures in cancer risk. J. Occup. Med. v. 35, p. 43-41, 1993.
- SHINOZUKA, N. & LEE, C. Aggregate formation of humic acids from marine sediments. Mar. Chem. v. 33, p. 229-, 1991.
- SIMS, J. L., SIMS, R. C. & MATTHEWS, J. E. Approach to bioremediation of contaminated soil Haz. Waste Haz. Mater. v. 7, p. 117-149, 1990
- SINGLETON, I. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. J. Chem. Tech. Biotechnol. v. 59, p.9-23,1994.
- SMITH, M.; THURSTON, C. F. & WOOD, D. A. Fungal laccase: role in delignification and possible industrial applications. In: A. Messersschmidt (Ed). Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore. p. 201-207, 1997.

- SREBOTNIK, E.; JENSEN, K. A. & HAMMEL, K. E. Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic structures without lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 91, p. 12794-12797, 1994.
- SRINIVASAN. C., D SOUZA, T. M., BOOMINATHAN, K. & REDDY, C.A. Demonstration of laccase in the White rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Appl. Environ. Microbiol. v. 61, p. 4274-4277, 1995
- STEVESON, F. J. Humus chemistry, genesis, composition, reactions Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1982
- SURESH, P. V. & CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochem. v. 34, p. 257-267, 1999.
- SUZUKI, K.; SANGA, K.; CHIKAOKA, Y. & ITAGAKI, E. Purification and properties of cytochrome P-450 [P-450 (Lun)] catalyzing steroid 11 beta-hydroxylation in *Curvularia lunata*. Biochim. Biophys. Acta. v. 1203, p. 215-223, 1993.
- SZKLARZ, G.D., ANTIBUS, R.K., SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycol. v. 81, p. 234-240, 1989
- TANAKA, S.; OBA, K.; FUKUSHIMA, M.; NAKAYASU, K. & HASEBE, K. Water solubility enhancement of pyrene in the presence of humic substances. Anal. Chimia Acta. v. 337, p. 351-357, 1997.
- TEMP, U.; MEYRAHN, H. & EGGERT, C. Extracellular phenol oxidase patterns during depolymerization of low-rank coal by three basidiomycetes. Biotechnol. Lett. v. 21, p. 281-287, 1999.
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases Microbiol. v. 140, p. 19-26, 1994
- TIEHN, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Appl. Environ. Microbiol. v. 60, p. 258-263, 1994.
- TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science v. 221, p. 661-663, 1983

- TIEN, M., & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Science USA. v. 81, p. 2280-2284, 1984
- TRAPIDO, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. Environ. Poll. v. 105, p. 67-74, 1999.
- TUOR, U., WINTERHALTER, K. & FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. J. Biotechnol. v. 41, p. 1-17, 1995
- VALLI, K. & GOLD, M. H. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* J. Bacteriol. v. 174, p. 2131-2137, 1991
- VAN DEN BRINK, H.; VAN GORCOM, R. F. M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. & PUNT, P.J. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. Fungal Genet. Biol. v. 23, p. 1-17, 1998.
- VAN DYKE, M. I.; GULLEY, S.; LEE, H. & TREVORS, J. T. Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. J. Ind. Microbiol. v. 11, p. 163-170, 1993.
- VAN GINKEL, C. G. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. Biodegradation. v. 7, p. 151-164, 1996.
- VARADACHARI, V. & GHOSH, K. On humus formation. Plant Soil v. 77, p. 305-313, 1984.
- VARANASI U. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environmental. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, USA, 1989.
- VOGEL, T. M. & GRBIC-GALIC, D. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation Appl. Environ. Microbiol. v.52, p. 200-202, 1986
- VOLC, J. & ERIKSSON, K. E. Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Methods Enzymol. v. 161B, p. 316-322, 1988
- VOLC, J., KUBÁTOVÁ, E., SEDMERA, P., DANIEL, G. & GABRIEL, J. Pyranose oxidase and pyranose dehydratase: enzymes responsible for conversion of D-glucose to cortalcerone by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Arch. Microbiol. v. 156, p. 297-301, 1991
- VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; ANDEL, J. G.V. & RULKENS, W. H. Influence of non ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. v. 61, p. 1699-1705, 1995.

- VON SZENTPALY, L. & SHAMOVSKY, I. L. Molecular mechanics explanation for the stereochemical and shape selectivity of B-DNA for “Bay-Region” carcinogens. Mol. Pharm. v. 47 (3), p. 624-629, 1995.
- WALLER, R. E. 60 years of chemical carcinogens: Sir Ernest Kennaway in retirement. J. Royal Soc Med. v. 87, p. 96-97, 1994.
- WALTER, U., BEYER, M., KLEIN, J. & REHM, H. J. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UWT Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 34, p. 671-676, 1991
- WANG, X., YU, X. & BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil Environ. Sci. Technol. v. 24, p. 1086-1089, 1990
- WARIISHI, H. & GOLD, M.H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. J. Biol. Chem., v. 265, p. 2070-2077, 1990
- WARIISHI, H., VALLI, K. & GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelators J. Biol. Chem. v. 267, p. 23688-23695, 1992
- WARIISHI, H., VALLI, K. & GOLD, M. H. Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model cimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Biochem. v. 28, p. 6017-6023, 1989
- WARIISHI, H., VALLI, K. & GOLD, M.H. *In vitro* Depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. v. 176, p. 269-275, 1991
- WILLMANN, G. & FAKOUSSA, R. M. Biological bleaching os water-soluble coal macromolecules by a basidiomycete strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 47, p. 95-101, 1997.
- WILLUMSEN, P. A. & KARLSON, V. Screening of bacteria, isolated from PAH-contamineted soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation. v. 7, p. 415-423, 1997.
- WUNDER, T.; MARR, J.; KREMER, S.; STERNER, O. & ANKE, H. 1-methoxypyrene and 1,6-dimethoxypyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch. Microbiol. v. 167, p. 310-316, 1997.
- XU, F. Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials ace well ace halide inhibition. Biochemistry. v. 35, p. 7608-, 1996.

- XU, H.; LESAGE, S. & DURHAM, L. The use of humic acids to enhance removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers. Part I: Laboratory studies. 4<sup>th</sup> Annual Groundwater and Soil Remediation. Calgary, Alberta, p. 635-666, 1994.
- YANG, G. P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the South China. Environ. Poll. v. 108, p. 163-171, 2000.
- YOSHIDA, H. Chemistry of Lacquer (Urushi) part I Chem. Soc. v. 43, p. 472-486, 1883
- ZHANG, Y. & MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant) Appl. Environ. Microbiol. v. 58, p. 3276-3282, 1992
- ZIERATH, P. L., HASSETT, J. J. & BANWART, W. L. Sorption of benzidine by sediments and soils Soil Sci. v. 129, p. 277-281, 1980