

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSOS QUÍMICOS**

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL DE
DEGRADAÇÃO DE DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM**

**Rose Marry Araújo Gondim Tomaz
Autora**

**Prof^a.Dra. Telma Teixeira Franco
Orientadora**

**Prof^a.Dra. Lúcia Regina Durrant
Co-orientadora**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia
Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutor**

**Campinas – SP
Dezembro de 2003**



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/Unicamp
	7591a
V	EX
TOMBO BC	58782
PROC.	16-114-09
C	☐
D	☒
PREÇO	11.000
DATA	01.07.09
Nº CPD	

CM001982B5--9

Bibid: 317491

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

T591a Tomaz, Rose Marry Araújo Gondim
Avaliação de fungos com potencial de degradação de diuron e pyriithiobac-sodium / Rose Marry Araújo Gondim Tomaz. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadores: Telma Teixeira Franco e Lúcia Regina Durrant.

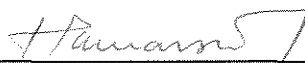
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Herbicidas. 2. Biodegradação. 3. Enzimas de fungos. I. Franco, Telma Teixeira. II. Durrant, Lúcia Regina. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Drª Telma Teixeira Franco
(Orientadora)



Dr. Itamar Soares de Melo
(Membro)



Prof.º Dr. Sílvio Roberto Andrietta
(Membro)



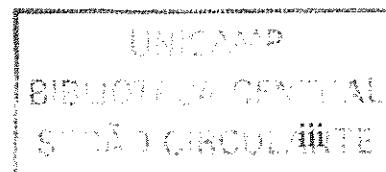
Dra. Andrea Roberta Clemente
(Membro)



Dr. Robert Deuber
(Membro)

Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida
(Membro)

Dra. Aline Carvalho da Costa
(Membro)



Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Rose Marry Araújo Gondim Tomaz e aprovada pela banca examinadora em 18 de dezembro de 2003.



Prof.Dra. Telma Teixeira Franco

**Todas as vezes que adquirires um novo interesse,
ainda mais, alcançares uma nova conquista, estarás
aumentando o teu poder de vida.**

William Lyon Phelps

**Aos meus três amores
Edson, Vitor e Rafael.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

- À professora Telma Teixeira Franco, pela orientação, pela confiança e amizade.
- À professora Lúcia Regina Durrant, pela co-orientação, amizade, paciência e ensinamentos.
- Ao Instituto Agrônomo de Campinas, pela oportunidade.
- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, pelo apoio financeiro indispensável à realização desta tese.
- À Faculdade de Engenharia Química e de Alimentos, por tornar possível a realização deste trabalho.
- Aos Pesquisadores Drs. Nelson Paulieri Sabino e Edivaldo Cia pelo incentivo dado ao meu trabalho.
- A todas as minhas amigas do LSFM e da FEQ, Ani, Aninha, Ana Claudia, Claudinha, Daniela, Érika, Eliani, Fabiana, Gabriela, Karla, Kely, Luciana, Lara, Márcia e Sara, pelo convívio e apoio constantes. Vocês são muito especiais.
- À Isis e Andréa um agradecimento especial pela grande ajuda, incentivo e amizade.
- Aos Pesquisadores Maria do Carmo de S. Novo e Dr. Robert Deuber pela colaboração e amizade.
- Ao Lúcio pela colaboração e amizade.
- Ao meus amigos do dia-a-dia, Azzini, Norma, Dulce, Tieta, Lurdinha, Iraci, Ivani, Dna. Maria, Vera e Waldemar pela compreensão e otimismo.

RESUMO

Inicialmente, foi desenvolvido experimento em casa-de-vegetação com dois tipos de solo, arenoso e argiloso, com o objetivo de avaliar o efeito dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium na microbiota do solo. Doses de diuron e pyriithiobac-sodium de 0, 1, 2, 4 e 8 vezes a dose recomendada para o campo foram aplicadas sobre plantas de algodão, cv IAC 23. Amostras de solos foram coletadas periodicamente para levantamento das populações de fungos, bactérias e actinomicetos, determinação do pH e seleção de fungos no solo com a mais alta dose dos herbicidas. Houve diferença entre a biota dos solos para ambos os herbicidas. A população de fungos e bactérias diminuiu com o acréscimo das doses aplicadas a de actinomicetos aumentou para o solo argiloso e reduziu para o arenoso quando se utilizou o diuron. Para o pyriithiobac-sodium ocorreu aumento da população de fungos, redução do número de bactérias e, em relação aos actinomicetos, a população diminuiu no solo arenoso com o aumento das doses. No solo argiloso, apenas na dose recomendada apresentou crescimento de actinomicetos, havendo redução com as demais doses. Os 106 fungos isolados foram utilizados em experimentos para seleção de linhagens resistentes a concentrações elevadas dos herbicidas, utilizando meio sólido suplementado com concentrações crescentes dos herbicidas especificados. Em paralelo, realizou-se a seleção com 24 linhagens de fungos basidiomicetos utilizando, também, meio sólido com elevadas doses dos herbicidas como fonte de carbono. No total, treze fungos foram selecionados (*Pleurotus* sp (BCCB 507), *Pleurotus* sp (CCB 068), *Pleurotus* sp 016, *Agaricus campestris*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e os isolados de solo DP24e, DP24o, DRP02n, DRP02e, SP16a, SRP17g, SRP17c e SRP20e). Esses fungos foram incubados em meio líquido de minerais por três dias. Após os três dias, adicionou-se 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de diuron ou 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de pyriithiobac-sodium ao frasco de cultura e incubou-se por 14 dias. As atividades ligninolíticas e porcentagem de degradação foram analisadas, quando se utilizou diuron como fonte de carbono, as linhagens *Pleurotus* sp (CCB 068) (85,63%), *Pleurotus* sp (BCCB 507) (64,30%), *Pleurotus* sp 016 (62,06%) e os isolados de solo SRP17c (71,08%), SRP17g (69,42%), e SRP20e (66,38%) apresentaram as mais altas porcentagens de degradação. Manganês-peroxidase foi a enzima predominante produzida por todas as linhagens. Quando se utilizou pyriithiobac-sodium, somente três linhagens foram capazes de degradá-lo: *Pleurotus* sp (CCB 068) (61,35%), *Agaricus Campestris* (37,86%) e *Pleurotus* sp (BCCB 507) (16,10%). A MnP foi também a enzima predominante. Considerando ambos os herbicidas, a linhagem *Pleurotus* sp (CCB 068) foi a melhor de todas as testadas. É importante mencionar que as mais altas atividades enzimáticas foram produzidas por essa linhagem, independentemente do herbicida. Com os resultados de degradação e de atividade enzimática mais expressivos, foram selecionadas quatro linhagens: *Pleurotus* sp (BCCB 507), SRP17c, *Pleurotus* sp (CCB 068) e *Ag. Campestris*; nas três primeiras se utilizou diuron como fonte de carbono; e nas duas últimas, pyriithiobac-sodium. Esses fungos cresceram em concentrações diferentes de diuron (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e pyriithiobac-sodium (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo incubados por 30 dias, determinando-se também a porcentagem de degradação. Quando se utilizou diuron, a mais alta porcentagem de degradação foi obtida no sobrenadante da linhagem SRP17c (35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (84,74%), seguida da linhagem SRP17c (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (73,46%) e *Pleurotus* sp (CCB 068) (35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (55,11%). Para o pyriithiobac-sodium, a melhor porcentagem de degradação foi obtida no sobrenadante da linhagem *Pleurotus* sp (CCB 068) (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (94,61%), seguido da linhagem *Pleurotus* sp (CCB 068)(10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (86,42%) e *Ag. Campestris* (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (53,36%). De acordo com a identificação realizada para o fungo isolado de solo SRP17c, sugere-se que pertença ao gênero *Rhizopus*.

Palavras-chave: Diuron, Pyriithiobac-sodium, biodegradação, enzimas ligninolíticas.

ABSTRACT

Pyrithiobac-sodium is a post-emergence herbicide for early application, registered for broadleaves control in cotton crops. Diuron is a phenylurea used for weed control on non-crop areas and selectively on crops such as cotton, sugarcane, citrus and pineapple. At present, this herbicide is one of the most used in Brazil. Experiments were carried out in green-house, in order to evaluate the effect of these two compounds on the soil biota. Such compounds were applied in 0, 2, 4 and 8 times above the recommended rate, and cotton IAC 23 was used. Cotton was planted in sandy and clay soils. Soil samples were collected periodically, until 70 and 135 days after application for pyrithiobac-sodium and diuron, respectively. Counting of fungi, actinomycete and bacteria population was realized, and also soil pH variation and several fungi strains selectively isolated from soil samples previously treated with the higher concentration of diuron and pyrithiobac-sodium. The biota showed be different regarding the two soil types. To the sandy soil, the increase of pyrithiobac-sodium rate reduced the actinomycete population. To clay soil, only the recommended rate increased the number of actinomycete, with reduction for higher rates. In both soils the fungi population increased with the increase of the herbicide rate, occurring the opposite for the bacteria population. For the both of soils treated with diuron, the fungi and bacteria population reduced with the increase of the herbicide rate, and actinomycete population increased in the clay soil and was reduced in the sandy soil. The pH increased gradually during the time in both of the soils studied. A total of 106 strains were isolated, of which 8 were selected for further evaluation of potential pesticides degradation on the highest levels of these two compounds: DP24e, DP24o, DRP02n, DRP02e SP16a, SRP 17c, SRP17g and SRP20e. Twenty-four ligninolytic white-rot fungi were also used in the preliminary screen. A solid medium containing 1x, 10x or 100x of the pesticides dosages indicated for fielding application was used as carbon sources. Five strains were selected: *Pleurotus* sp BCCB 507, *Pleurotus* sp CCB 068, *Pleurotus* sp. 016, *Agaricus campestris*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725. These fungi were grown in liquid medium containing minerals and yeast extract for three days when 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of diuron or 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of pyrithiobac-sodium were added in the culture flasks, and the cultivators were carried out for up to 14 days. Samples were collected and the supernatants were used for the determination of ligninolytic activities (by spectrophotometric assays) and degradation (by HPLC). When diuron was used, highest degradation were observed by the strains *Pleurotus* sp CCB 068 (85,63%), *Pleurotus* sp BCCB 507 (64,30%), *Pleurotus* sp.016 (62,06%), and the soil-isolated SRP17c (71,08%), SRP17g (69,42%) and SRP20e (66,38%). MnP was the predominant enzyme produced by all strains. When Pyrithiobac-sodium was used for as carbon source in the medium only three strains were able to degrade it: *Pleurotus* sp. CCB 068 (61,35%), *Ag. campestris* (37,86%) and *Pleurotus* sp BCCB 507 (16,105%); MnP was also the predominant ligninolytic enzyme produced. A new selection of the best strains was carried out based on the levels of herbicides degradation, and also regarding the ligninolytic activities produced by the fungi. The four strains selected were cultivated for 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 and 30 days in the diuron (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$) or pyrithiobac-sodium (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Herbicides degradation measured by HPLC, varied with each strain. Highest degradation of diuron (84,74%) was detected by the strain SRP17c 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, followed by strain SRP17c 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (73,46%) and *Pleurotus* sp (CCB 068) 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (55,11%). The greatest degradation of pyrithiobac-sodium (94,61%) was observed with *Pleurotus* sp (CCB 068) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, followed by strain *Pleurotus* sp (CCB 068) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (86,42%) and also for *Ag. Campestris* 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (53,36%). The strain identification SRP17c suggests that this strain belongs to the Rhizopus Class.

Key-words: Diuron, Pyrithiobac-sodium, biodegradation, lygninolytic enzymes.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Agrotóxicos.....	4
2.2 Biodegradação de agrotóxicos	6
2.3 Diuron.....	10
2.3.1 Caracterização	10
2.3.2 Impacto ambiental do diuron.....	12
2.3.3 Degradação microbiana do diuron	14
2.4 Pyriithiobac-Sodium	16
2.5 Fungos	19
2.6 Estrutura da lignina	20
2.7 Enzimas ligninolíticas e microrganismos produtores.....	21
2.7.1 Peroxidases	24
2.7.2 Polifenol oxidases (fenoloxidasas).....	28
2.7.3 Enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Herbicidas utilizados.....	32
3.2 Experimento na casa de vegetação.....	32

3.3	Estudo comportamental dos microrganismos durante o experimento na casa de vegetação.....	34
3.4	Triagem dos isolados fúngicos do solo com potencial de degradação dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium.....	37
3.5	Seleção dos fungos ligninolíticos.....	37
3.6	Manutenção das linhagens	38
3.7	Seleção das linhagens em meio sólido.....	38
3.8	Experimentos de biodegradabilidade do diuron e pyriithiobac-sodium.....	40
3.8.1	Microrganismos selecionados	40
3.8.2	Preparo das soluções-estoque.....	41
3.9	Determinação das enzimas ligninolíticas.....	42
3.9.1	Lignina peroxidase (LiP) (E.C.1.11.1.7).....	43
3.9.2	Manganês peroxidase (MnP) (E.C.1.11.1.13)	43
3.9.3	Lacase (E.C.1.10.3.2).....	43
3.9.4	Peroxidase (E.C.1.11.1.7.).....	44
3.10	Análise da degradação dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium por cromatografia líquida de altaeficiência (Clae).....	44
3.11	Degradação do diuron e pyriithiobac-sodium utilizando os inóculos selecionados.....	45
3.12	Determinação da formação de biomassa fúngica.....	46
3.13	Identificação do isolado de solo Srp17c.....	47

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1 Efeito de doses do herbicida diuron e pythiobac-sodium na biota do solo	48
4.1.1 Efeito das doses de diuron aplicados no solo arenoso e argiloso	48
4.1.2 Efeito das doses de pyrihiobas-sodium aplicados no solo arenoso e argiloso.	55
4.2 Isolamento de fungos de solo com potencial para a degradação dos herbicidas diuron e pyrihiobac-sodium	61
4.3 Seleção das linhagens dos basidiomicetos com potencial de degradação dos herbicidas diuron e pyrihiobac-sodium	65
4.4 Diuron como fonte de carbono	70
4.5 Produção de enzimas ligninolíticas	71
4.6 Pyrihiobac-sodium como fonte de carbono	80
4.7 Produção de enzimas ligninolíticas	81
4.8 Degradação do diuron e pyrihiobac-sodium	86
4.8.1 Diuron	87
4.8.2 Pyrihiobac-sodium	88
4.9 Determinação da biomassa fúngica.....	89
4.9.1 Adição de diuron e pyrihiobac-sodium.....	89
4.10 Identificação da linhagem Srp17c	92
5. CONCLUSÕES	93
6. SUGESTÕES	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Fórmula estrutural do diuron, 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia.	10
Figura 2.2: Trajetória da degradação do diuron por microrganismos aeróbicos (SCRIBNER et al., 2000).	11
Figura 2.3: Fórmula estrutural do pyriithiobac-sodium	16
Figura 2.4: Metabólitos do Pyriithiobac-sodium; A. O-desmetil pyriithiobac-sodium; B. conjugado de glicose (DuPont Agricultural Products).	18
Figura 2.5: Estrutura química provável da lignina (LEE, 1997).	21
Figura 2.6: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (CAMERON et al., 2000).	26
Figura 2.7: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (CAMERON et al., 2000).	28
Figura 2.8: Mecanismo de oxidação proposto para Lacase (SUGUMARAN e BOLTON, 1998).	29
Figura 4.1: Crescimento de algodão (IAC 23), plantado em solo arenoso com diferentes doses de diuron.	49
Figura 4.2: Crescimento de algodão (IAC 23), plantado em solo argiloso com diferentes doses de diuron.	50
Figura 4.3: Variação do pH, em solo argiloso com aplicação de diuron, em função do tempo.	50
Figura 4.4: Variação do pH, em solo arenoso com aplicação de diuron em função do tempo.	51
Figura 4.5: Variação no número de bactérias em solo argiloso contendo diuron.	51
Figura 4.6: Variação no número de bactérias em solo arenoso contendo diuron.	52

Figura 4.7: Variação da população de fungos em solo argiloso contendo diferentes doses de diuron.	53
Figura 4.8: Variação da população de fungos em solo arenoso contendo diferentes doses de diuron.	54
Figura 4.9: Variação no número de actinomicetos em solo argiloso contendo diuron.	54
Figura 4.10: Variação no número de actinomicetos em solo arenoso contendo diuron.	55
Figura 4.11: Crescimento de algodão (IAC 23) plantado em solo arenoso com diferentes dosagens de pyriithiobac-sodium.....	56
Figura 4.12: Crescimento de algodão (IAC 23) plantado em solo argiloso com diferentes dosagens de pyriithiobac-sodium.....	56
Figura 4.13: Variação do pH, em solo argiloso, com aplicação de pyriithiobac-sodium, em vista das diferentes épocas de amostragens.	57
Figura 4.14: Variação do pH, em solo arenoso, com aplicação de pyriithiobac-sodium, em vista das diferentes épocas de amostragens.	57
Figura 4.15: Variação no número de bactérias em solo argiloso contendo pyriithiobac-sodium.....	58
Figura 4.16: Variação no número de bactérias em solo arenoso contendo pyriithiobac-sodium.....	59
Figura 4.17: Variação no número de fungos em solo argiloso contendo pyriithiobac-sodium.....	59
Figura 4.18: Variação no número de fungos em solo arenoso contendo pyriithiobac-sodium.....	60
Figura 4.19: Variação no número de actinomicetos em solo argiloso contendo pyriithiobac-sodium.....	60
Figura 4.20: Variação no número de actinomicetos em solo arenoso contendo pyriithiobac-sodium.....	61
Figura 4.21: Crescimento do isolado de solo DRP02n quando foi utilizado 3.325 µg mL ⁻¹ de diuron.	62

Figura 4.22: Crescimento do isolado de solo SRP17c quando foi utilizado 217,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de pyriithiobac-sodium.....	62
Figura 4.23: Crescimento das linhagens <i>Pleurotus</i> sp florida 001 (sensível) e <i>Pleurotus</i> sp (CCB068) (resistente) quando foi utilizado o herbicida diuron na concentração de 332,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	69
Figura 4.24: Crescimento das linhagens <i>Pleurotus</i> sp (P1) (sensível) e <i>Pleurotus</i> sp CCB068 (resistente) quando foi utilizado o herbicida pyriithiobac-sodium na concentração de 21,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$	70
Figura 4.25: Atividades enzimáticas produzidas pelas linhagens <i>Pleurotus</i> sp (BCCB507), <i>Pleurotus</i> sp (CCB068), SRP17c e porcentagem de degradação quando se utilizou diuron como fonte de carbono na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	76
Figura 4.26: Cromatograma do controle contendo diuron.	77
Figura 4.27: Cromatogramas do isolado de solo SRP17c crescido em diuron em (–) 3 dias, (–) 7 dias, (–) 10 dias, (–) 14 dias.	78
Figura 4.28: Cromatograma da linhagem <i>P.chrysosporium</i> crescida em diuron em (–) 3 dias, (–) 7 dias, (–) 10 dias e (–) 14 dias.	79
Figura 4. 29: Atividades enzimáticas produzidas pelas linhagens <i>Pleurotus</i> sp (CCB068), <i>Ag.campestris</i> e porcentagem de degradação quando se utilizou pyriithiobac-sodium como fonte de carbono na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	85
Figura 4.30: Cromatograma do controle contendo pyriithiobac-sodium...	86
Figura 4.31: Cromatograma da linhagem <i>Pleurotus</i> sp (CCB 068) crescida em pyriithiobac-sodium em (–) 3 dias, (–) 7 dias, (–) 10 dias e (–) 14 dias.	86
Figura 4.32: Cromatograma da linhagem <i>P.chrysosporium</i> crescida em pyriithiobac-sodium em (–) 3 dias, (–) 7 dias, (–) 10 dias e (–) 14 dias.	87
Figura 4.33: Porcentagem de degradação de diuron produzida pelas linhagens após crescimento em diuron nas concentrações de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$	88

Figura 4.34: Porcentagem de degradação de pyriithiobac-sodium produzida pelas linhagens após crescimento em pyriithiobac-sodium nas concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	90
Figura 4.35: Formação da biomassa fúngica, após crescimento das linhagens em diuron nas concentrações de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$	91
Figura 4.36: Formação de biomassa, após crescimento das linhagens em pyriithiobac-sodium nas concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$...	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Análise de fertilidade do solo de amostras coletadas na camada de 0-20 cm, nas estações experimentais do IAC, localizadas em Ribeirão Preto e Pindorama.....	33
Tabela 3.2: Doses aplicadas de diuron e pyriithiobac-sodium em experimento com solo argiloso e arenoso.	34
Tabela 3.3: Composição do Meio Ágar Mineral para actinomicetos, pH final de 7,3 em 1000mL de água destilada.....	36
Tabela 3.4: Composição do meio líquido base em 1000 mL de água destilada.	39
Tabela 4.1: Fungos isolados de solos tratados com diuron.....	62
Tabela 4.2: Fungos isolados de solos tratados com pyriithiobac-sodium .	63
Tabela 4.3: Seleção dos isolados de solo mais resistentes aos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium.....	64
Tabela 4.4: Crescimento das linhagens de basidiomicetos submetidas a três diferentes concentrações de diuron	65
Tabela 4.5: Crescimento das linhagens de basidiomicetos submetidas a três diferentes concentrações de pyriithiobac-sodium.....	66
Tabela 4.6: Valores de pH dos fungos que cresceram utilizando diuron como fonte de carbono.....	70
Tabela 4.7: Atividade de MnP e LiP dos fungos crescidos em diuron como fonte de carbono.....	72
Tabela 4.8: Atividade de Peroxidase dos fungos crescidos em diuron como fonte de carbono.....	73
Tabela 4.9: Porcentagem de degradação do diuron produzida pelas linhagens crescidas com uma concentração inicial de 25 µg mL ⁻¹	74
Tabela 4.10: Valores de pH dos fungos que cresceram em pyriithiobac-sodium como fonte de carbono.....	80
Tabela 4.11: Atividade de MnP e LiP dos fungos crescidos em pyriithiobac-sodium como fonte de carbono.....	81

Tabela 4. 12: Atividade de lacase e peroxidase dos fungos crescidos em pyrithiobac-sodium como fonte de carbono	82
Tabela 4.13: Porcentagem de Degradação de pyrithiobac-sodium produzida pelas linhagens após crescimento na concentração de 10 µg mL ⁻¹	83

1. INTRODUÇÃO

Anualmente, a população mundial distancia-se do aumento da produção agrícola e, conseqüentemente, é imperativo a elevação global da produção de alimentos. A escassez de alimentos leva não somente à má nutrição e fome, mas também à instabilidade social, econômica e política. Uma alternativa viável para suprir a previsível crise na agricultura é aumentar a produção por área, embora esse meio possa causar sérias conseqüências ambientais (KENAWY, 1992 apud PRADO et al., 2002).

O emprego de agrotóxicos tornou-se parte integrante da agricultura moderna e tem permitido aumentar a produtividade agrícola levando ao aumento qualitativo e quantitativo da produção de alimentos. Esse procedimento tem-se tornado uma prática estabelecida pelos agricultores em todo o mundo, através da qual permite-se controlar ou erradicar, em muitos países, alguns vetores de doenças endêmicas transmissíveis (MUNNHECK, 1978; KUMAR et al, 1996).

Os métodos atuais utilizados para aumentar a produção agrícola não garantem alta qualidade do meio ambiente. Assim, para o aumento da produção são necessários o uso de herbicidas, inseticidas, fungicidas e controle de predadores. Dessa maneira, o uso de agrotóxicos na agricultura, principalmente os herbicidas, por serem os compostos mais utilizados no mundo, é preocupante, visto que esses produtos são reconhecidos causadores de impactos prejudiciais ao ambiente (PRADO e AIROLDI, 2002).

Os herbicidas são compostos xenobióticos de diversos grupos químicos, que apresentam ação sobre plantas daninhas, e cuja eficácia está relacionada às características físico-químicas e biológicas do solo (ROQUE, 2000). Eles têm sido utilizados globalmente em diversas culturas agrícolas de importância econômica, como o algodão por exemplo. Para seu cultivo, os herbicidas diuron (3-(3,4 diclorofenil)1,1-dimetil uréia),

pyrithiobac-sodium, sódio 2-cloro-6-[(4,6-dimetoxipirimidina-2 yl)thio]benzoato e outros agrotóxicos são aplicados em grande escala. O uso indiscriminado desses agrotóxicos pode afetar o meio, contaminando o solo, a água, além de causar fitotoxicidade em plantas não-alvo.

A trajetória dos herbicidas no ecossistema edáfico é dependente de vários mecanismos abióticos, tais como degradação fotoquímica, adsorção por elementos do solo, absorção pelas plantas ou lixiviação, sendo também governado em larga escala pela degradação efetuada pelos microrganismos existentes (AISLABIE et al., 1995).

A maioria dos microrganismos degrada moléculas complexas de herbicidas via cometabolismo, ou seja, utilizam outras fontes de carbono e energia para o crescimento e sobrevivência e, nesse processo, degradam enzimaticamente os herbicidas. Entretanto, algumas espécies conseguem utilizar essas moléculas como fonte de carbono e energia, o que pode ser considerado uma vantagem para a degradação desses compostos em ambientes com baixa concentração de carbono, tipo de degradação conhecida como catabolismo (SETTE, 2001).

Os fungos, importantes componentes da microbiota do solo, apresentam atividade degradativa de amplo espectro, podendo secretar grande diversidade de enzimas extracelulares, o que os tornam capazes de metabolizar moléculas recalcitrantes, incluindo os herbicidas.

No grupo dos basidiomicetos lignocelulolíticos encontramos organismos que atuam como importantes decompositores, sendo os principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Degradam os componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina a partir dos quais obtém energia para seu crescimento e reprodução. Esses microrganismos são os únicos conhecidos com a capacidade de metabolizar completamente a molécula de lignina a gás carbônico e água, sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (KIRK, 1987).

A habilidade dos fungos de decomposição branca em degradar a lignina, polímero complexo e heterogêneo, mostra a baixa especificidade dos substratos das enzimas extracelulares produzidas por esses fungos, que são capazes de degradar amplo espectro de organopoluentes recalcitrante ao meio ambiente, incluindo os herbicidas.

Uma vez conhecidos os problemas causados pelos herbicidas ao meio ambiente e considerando o potencial enzimático dos fungos basidiomicetos (ligninolíticos) e dos prováveis fungos isolados de solo, capazes de degradar herbicidas, foram traçados para este estudo os seguintes objetivos:

- ❖ Selecionar fungos *Basidiomicetos*, da coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que tenham capacidade para degradar os herbicidas diuron e pyritithiobac-sodium.
- ❖ Verificar o comportamento de fungos, bactérias e actinomicetos em solos argilosos e arenosos, onde foram aplicadas diferentes dosagens dos herbicidas diuron e pyritithiobac-sodium e plantada a variedade de algodão IAC 23;
- ❖ Isolar fungos dos solos arenosos e argilosos tratados com diuron e pyritithiobac-sodium;
- ❖ Detectar os sistemas enzimáticos envolvidos na degradação de diuron e pyritithiobac-sodium, principalmente aquelas enzimas ligninolíticas;
- ❖ Avaliar fungos da classe *Basidiomicetos* e isolados de solo quanto ao potencial de degradação dos herbicidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos, são compostos químicos orgânicos, em sua maioria sintéticos, formulados para controlar ou erradicar, de maneira geralmente seletiva, plantas e animais considerados daninhos em uma cultura agrícola ou criação animal (FRIGHETTO, 1997). Esses compostos possuem toxicidade seletiva para grupos de organismos específicos, mas também podem ser tóxicos para espécies não-alvo e apresentar efeito acumulativo ao longo da cadeia alimentar. Ao mesmo tempo em que o emprego de agrotóxicos trouxe benefícios para a população, colaborou também para ampliar um problema ambiental, ou seja, a poluição (TIMBRELL, 1989 apud SETTE, 2001).

Muitas vezes, parte da poluição ambiental é resultante da aplicação em doses não recomendadas, ou seja, superdosagens. Outras vezes, soluções aquosas de agrotóxicos oriundas da lavagem de tanques de estocagem ou dos equipamentos utilizados para aplicação, são lançadas no ambiente pelos aplicadores sem o menor critério (CHEN e MULCAHNDANI, 1998). Esses produtos apresentarão um período variável de persistência no ambiente, após o contato com o solo, podendo-se ligar aos seus constituintes através de interações físicas ou químicas com intensidade variável, ou, quando solubilizados, podem ficar incorporados aos corpos d'água subterrâneos (KIM et al., 1997)

A população mundial cresce cerca de 2% a cada ano. Essa taxa de crescimento significa que 93 milhões de pessoas adicionais por ano devem ser providas de alimentos. A população cresce enquanto as terras adequadas para a agricultura estão diminuindo, principalmente, devido à erosão do solo. A necessidade de elevar o suprimento global de alimentos, diante do aumento da população e a diminuição das terras adequadas para a agricultura, mostra a importância da agricultura intensiva e sustentável. Os agrotóxicos têm sido parte integrante dessa agricultura

desde a revolução verde na Ásia nos anos 70 (SOMASUNDARAM e COATS, 1991).

Os países que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica - África, Ásia e América Latina - sofreram fortes pressões de órgãos financiadores internacionais para adquirir essas substâncias químicas. A alegação era que os agrotóxicos garantiriam a produção de alimentos para combater a fome. Com o inofensivo nome de “defensivos agrícolas”, eram incluídos compulsoriamente, juntamente com adubos e fertilizantes químicos, nos financiamentos agrícolas. Sua utilização na agricultura nacional em larga escala ocorreu a partir da década de 70 (ARAÚJO et al., 2000).

O mercado mundial de agrotóxicos movimenta atualmente US\$ 30 bilhões; e de fertilizantes, US\$ 50 bilhões. O Brasil é o 3°. maior consumidor de agrotóxicos e movimenta US\$ 2,5 bilhões. Entre os agrotóxicos, os herbicidas representam a maior parcela, tanto em âmbito mundial como no Brasil, sendo 78% de todos os produtos utilizados em culturas agrícolas (FRIGHETTO, 1997). Calcula-se que somente 0,1% atinge o alvo específico, enquanto os restantes 99,9% da aplicação tem potencial para agir em diferentes compartimentos ambientais tais como o solo, águas residuais e subterrâneas (UETA et al., 2003).

Os agrotóxicos, de todos os compostos que atingem o solo intencionalmente, merecem atenção especial, pois seu desaparecimento, persistência e transformação indicam sua eficácia como produto e seu perigo potencial para a microbiota, a qualidade do ambiente e a vida no planeta (FAY et al., 1997).

Os agrotóxicos, considerados xenobióticos, são sintetizados pelo homem, não tendo semelhanças com os compostos químicos naturais e, portanto, estranhos aos sistemas biológicos. Esses compostos são, muitas vezes, recalcitrantes, ou seja, resistentes à mineralização, podendo causar reações adversas aos seres vivos (REZENDE et al., 2002).

Freqüentemente, aplicações maciças em vastas áreas de monoculturas agrícolas estão associadas às contaminações ambientais e aos problemas para a saúde humana (KUMAR et al., 1996). O acúmulo de agrotóxicos na biosfera pode criar um “stress” ecológico, resultando na contaminação de recursos naturais e acumulação nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo extremamente prejudicial aos seres vivos nos níveis mais altos, incluindo o homem (GOLOVLELA et al., 1992). Além disso, diversos agrotóxicos apresentam persistência no solo e podem alcançar facilmente os lençóis freáticos, devido à grande mobilidade das moléculas.

Os agrotóxicos são constituídos por uma ou várias substâncias químicas, destinadas a prevenir ou controlar insetos, doenças de plantas, plantas daninhas, fungos, nematóides, roedores, entre outros. Também podem ser utilizados como reguladores do crescimento, desfolhantes e dessecantes. Ao mesmo tempo em que o emprego de pesticidas trouxe benefícios para a população, colaborou também para ampliar um problema ambiental, ou seja, a poluição (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998)

2.2 BIODEGRADAÇÃO DE AGROTÓXICOS

Por muitas décadas, os produtos químicos industriais vêm sendo despejados no meio ambiente, em grande escala. Muitos desses produtos são rapidamente degradados por microrganismos presentes no solo e na água. Contudo, um número significativo de moléculas persistem e acumulam-se no meio ambiente, sendo degradadas de forma mais lenta (HIGSON, 1991).

A biodegradação de agrotóxicos ocorre na maioria dos solos, sendo os fatores de maior importância a disponibilidade do composto e a presença de microrganismos aptos a degradá-los. A disponibilidade é dependente de fatores como propriedades físicas e químicas, tanto do

composto como do solo. Dentre as propriedades do composto estão a solubilidade em água, alcalinidade e radicais reativos, entre outros. Entre as propriedades do solo, a quantidade e tipos de colóides são de grande importância na adsorção do composto às partículas sólidas presentes (MONTEIRO, 2001).

A importância das populações microbianas presentes no solo na degradação dos pesticidas é bastante conhecida. Segundo CRIPPS e ROBERTS (1978), tem-se observado que os agrotóxicos são suscetíveis à biodegradação, podendo ser degradados e utilizados pelos microrganismos do solo em sua busca por energia. No ambiente onde os agrotóxicos são aplicados há, geralmente, diferentes tipos de microrganismos, sendo bactérias, fungos e actinomicetos os principais encontrados no solo.

Segundo KAUFMAN e EDWARDS (1982), a participação microbiana na degradação de agrotóxicos no solo, em geral, envolve a utilização de sistemas enzimáticos que, bioquimicamente, transformam o agrotóxico em nutriente e em fonte de energia para o microrganismo. As enzimas são compostos orgânicos complexos que aceleram reações químicas sem se tornarem parte dos produtos finais, governando as reações de degradação dos pesticidas e tendo como função complexar nutrientes para as células microbianas. Podem ser intracelulares necessitando que o produto seja absorvido, ou extracelulares, em que são secretadas ou liberadas pelos microrganismos, para a solução do solo circunvizinha de onde se encontram e assim, podendo reagir com as moléculas de agrotóxicos.

KAUFMAN e EDWARDS (1982) observaram que, sob condições de campo, a degradação parece depender de fatores como: modo de ação do agrotóxico, dose, frequência e tempo decorrido entre aplicações, sistema de cultivo, sobrevivência de uma população enriquecida, complexidade da reação metabólica envolvida, comportamento físico-químico do agrotóxico no solo e condições ambientais existentes na época em que o agrotóxico estiver presente no solo.

O processo de biodegradação ideal resulta na mineralização do composto, com formação de CO_2 , H_2O , NO_3 , e outros compostos inorgânicos de ocorrência comum no ambiente (MONTEIRO, 1996).

Os microrganismos do solo, principalmente bactérias e fungos, têm sido relatados como principais degradadores de agrotóxicos. A tecnologia que utiliza microrganismos para o tratamento de áreas poluídas é denominada biorremediação (PARSEK et al., 1995).

De acordo com BOLLAG (1996), a biorremediação é o termo utilizado para descrever um fenômeno natural: a decomposição microbiana de produtos orgânicos. Essa tecnologia permite o tratamento de áreas contaminadas, pelo uso de células ou produtos celulares para a limpeza desses ambientes. Os microrganismos são capazes de incluir muitos compostos em suas vias metabólicas e transformá-los, parcial ou totalmente, diminuindo a toxicidade, ou eliminando-o através de mineralização até CO_2 e água. A biorremediação pode também se utilizar de plantas, capazes de retirar do solo compostos tóxicos através de seus sistemas enzimáticos, processo denominado fitorremediação (REZENDE, 2002).

Tecnologias avançadas tais como o uso de sistemas biológicos de tratamento para reduzir ou destruir resíduos perigosos são vistas como opção para a descontaminação do ambiente. Um dos campos mais promissores da biotecnologia que visa ao emprego dos microrganismos, direciona-se para a remediação de locais contaminados pelo uso de agrotóxicos. Uma vez que microrganismos presentes nos solos são capazes de degradar e mineralizar agrotóxicos, pode-se desenvolver biorremediação de sítios contaminados, empregando-se microrganismos selecionados (UETA et al., 2003).

A biorremediação tem por objetivo inocular o solo com microrganismos com capacidade de metabolizar os resíduos tóxicos presentes no ambiente. Essa técnica vem sendo desenvolvida visando explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana

para transformar contaminantes em produtos menos tóxicos que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais. Estudos elaborados com base no uso de microrganismos para degradar compostos químicos são descritos freqüentemente na literatura, bem como a degradação total ou parcial de agrotóxicos por populações microbianas naturais presentes em solos (UETA et al., 2003).

Isolamento, caracterização e identificação de microrganismos com habilidade em metabolizar materiais químicos potencialmente tóxicos é essencial para a biorremediação como medida mitigadora nos problemas decorrentes do uso irracional de agrotóxicos (UETA et al., 2003).

Tentativas para se aplicar processos de biorremediação em solos contaminados, por simples adição desses microrganismos ao solo, por meio de um processo conhecido como bioaumento ou bioampliação não vem alcançando o sucesso esperado. A incorporação de nutrientes ao solo ou outra manipulação da área, denominada bioestimulação, para promover o crescimento microbiano tem apresentado sucesso limitado (US Geological Survey) apud (UETA et al., 2003).

Pesquisadores têm estudado diversas maneiras para desenvolver um sistema de liberação controlada de microrganismos, semelhante aos empregados na indústria de medicamentos, como modelo a ser aplicado em processos de biorremediação. Através do emprego de conhecimentos da tecnologia farmacêutica, pretende-se incorporar os microrganismos de interesse aos sistemas de liberação controlada ou sustentada. Assim, estão sendo adaptadas microcápsulas, uso de matrizes poliméricas como derivados de alginato, amido ou ainda celulose. As microcápsulas poderão então ser lançadas em sítios contaminados permitindo a biorremediação do solo e conseqüente proteção dos aquíferos (UETA et al., 2003).

2.3 DIURON

2.3.1 Caracterização

O diuron 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetilureia (Figura 2.1) herbicida do grupo das feniluréias, é indicado para o controle de plantas daninhas em pré e pós-emergência. No Brasil, é utilizado para as culturas de algodão, abacaxi, alfafa, alho, cebola, mandioca, banana, batata, cacau, café, chá, cana-de-açúcar, citros, videira, pimenta do reino, seringueira, para áreas não cultivadas como os canais de irrigação e drenagem, ferrovias e rodovias (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

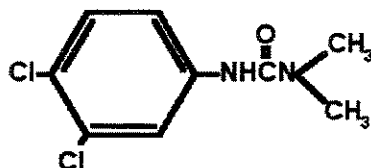


Figura 2.1: Fórmula estrutural do diuron, 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia.

Nas plantas suscetíveis, tem-se como mecanismo de ação a inibição da reação de Hill durante a fotossíntese, causando a clorose seguida de necrose das folhas. Esse herbicida é adsorvido pelos colóides do solo, sendo pouco lixiviável em solos argilosos, mas lixiviável nos arenosos (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

O consumo anual de diuron nos Estados Unidos é de aproximadamente de $1,8 \times 10^6$ kg de ingrediente ativo, sendo classificado como o terceiro herbicida mais perigoso para os lençóis de água (SCRIBNER et al, 2000). O diuron é degradado sob condições aeróbicas pelos microrganismos, que realizam N-dimetilação do grupo uréia e, posteriormente, a hidrólise podendo transformar-se nos seguintes metabólitos, N'-(3,4-diclorofenil)-N-metilureia (DCPMU), 3,4-dicloro-

fenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) (DALTON et al., 1966). Sob condições anaeróbia, ocorre a formação do produto de clorinado N'-(3-clorofenil)-N-metilureia (mCPMU). O produto tóxico, mutagênico e potencialmente carcinogênico de condensação do DCA, 3,3',4,4'-tetracloroazobenzeno, também é um metabólito potencial do diuron (FIELD et al., 1997). A trajetória de degradação do diuron e seus metabólitos, é mostrada na figura 2.2.

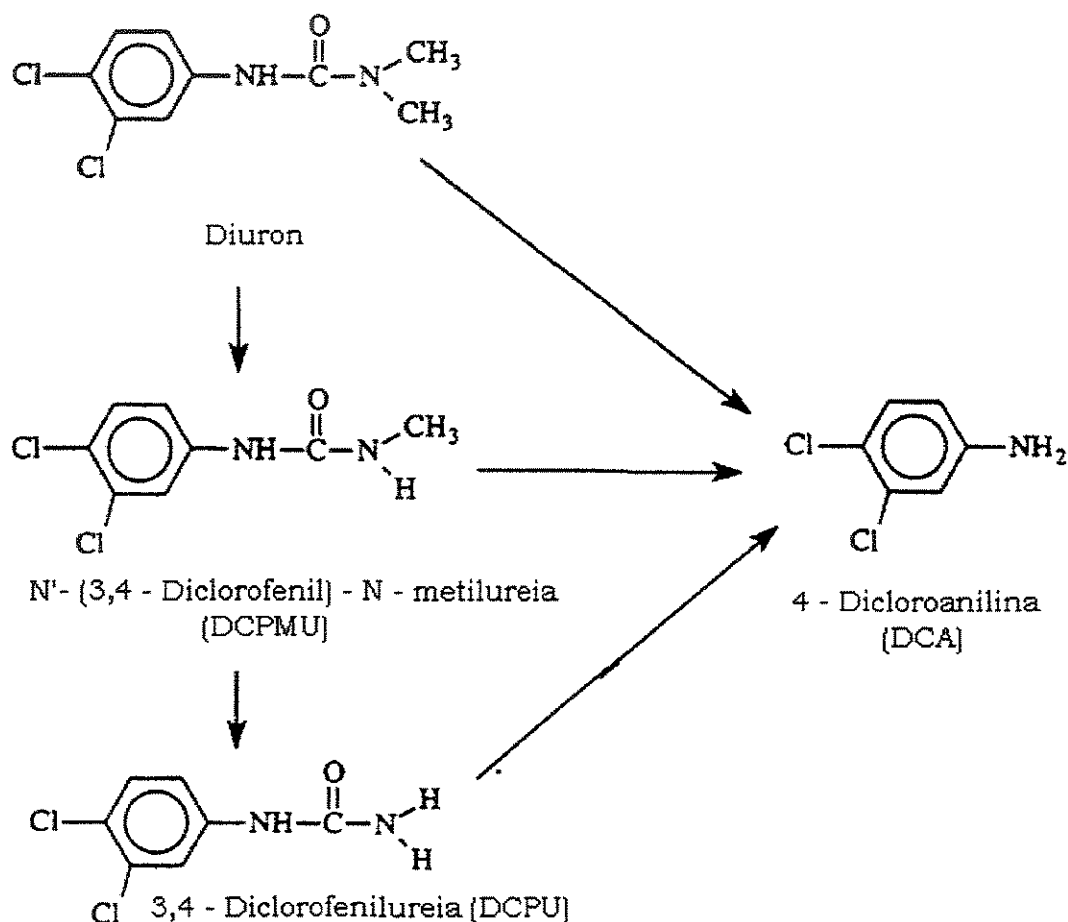


Figura 2.2: Trajetória da degradação do diuron por microrganismos aeróbicos (SCRIBNER et al, 2000).

2.3.2 Impacto ambiental do diuron

O diuron, quando aplicado nas doses recomendadas, apresenta persistência média no solo de quatro a oito meses, dependendo do tipo de solo e das condições climáticas. Quando aplicado em doses altas, persiste no solo por mais de um ano e, em doses esterilizantes, podem manifestar sintomas de fitotoxicidade por alguns anos. Sua degradação é, sobretudo, microbiana, sendo sensível à fotodecomposição e, moderadamente, à volatilização quando exposto na superfície do terreno por vários dias, sob condições de temperatura alta e baixa umidade (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 2002).

O principal fator responsável pela persistência e fitotoxicidade do diuron no solo é a adsorção (ROQUE, 2000). PAL et al. (1985), verificando o papel da adsorção no destino e comportamento do herbicida, observaram que as maiores taxas de adsorção encontravam-se relacionadas aos altos teores de argila e de matéria orgânica em solos com alta capacidade de troca catiônica. A adsorção do herbicida foi investigada em solo argiloso com 0,6 e 3,0 mg.kg⁻¹ de diuron e umidade de 35% e de 62%, por GAILLARDON (1996). Segundo o pesquisador, após o primeiro dia, houve adsorção de 50% do produto e, durante o restante do período de experimento (9 semanas), pouco foi dessorvido.

FERNANDEZ-PÉREZ et al. (1999), pesquisaram formulação de uma base de alginato-betonita-diuron para obter liberação controlada do herbicida. Essa formulação aumenta o tempo de vida do herbicida, reduz o risco de lixiviação na aplicação e torna-se mais segura para o usuário e os organismos não-alvo. Deduziram também, que o uso desse tipo de formulação poderia reduzir a possibilidade do diuron alcançar e contaminar os lençóis de água.

Em estudo comparativo do efeito tóxico do diuron livre e imobilizado em sílica gel na atividade microbiana do solo observou-se que, o diuron imobilizado apresentou efeito tóxico menor do que o herbicida

livre, com a vantagem de que a imobilização minimiza a perda por lixiviação e escoamento (PRADO et al., 2002).

Os herbicidas, por serem largamente utilizados na agricultura, podem causar sérios efeitos prejudiciais ao ecossistema, devido ao seu efeito tóxico a organismos não alvo. Os habitantes aquáticos estão particularmente sujeitos a esse tipo de contaminação, devido à lixiviação e ao escoamento de água a partir de áreas tratadas (BRETAUD et al., 2000).

BRETAUD et al. (2000) estudaram o efeito dos herbicidas carbofuron, diuron e nicosulfuron em diferentes concentrações, quanto à atividade de acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e nos músculos da espinha dorsal em “goldfish” (*Carassius auratus*); verificaram a inibição da AChE nestes peixes, quando expostos a concentrações subletais dos três herbicidas. A inibição da AChE pode afetar a locomoção e o equilíbrio do organismo exposto.

SUMPONO et al. (2003) verificaram o efeito de diuron em bactérias aquáticas, em pequeno lago de tratamento de águas residuais em escala-piloto, dando ênfase a *Aeromonas* spp, por serem consideradas bactérias indicadoras do estado higiênico da água. Após a contaminação com diuron, ocorreu aumento das bactérias totais, das bactérias cultivadas (em 30 vezes) e *Aeromonas* spp, por um período de duas semanas, voltando, posteriormente, para os valores iniciais. A quantidade de bactérias cultiváveis relativo à bactéria total foi de 0,2% no controle e 1,2% na lagoa tratada, enquanto a porcentagem de *Aeromonas* spp relativo à bactéria cultivável diminuiu de 6% a 10% para 2%. Os resultados sugerem que o diuron mantém o desenvolvimento de bactérias cultiváveis, devido à nova fonte de carbono derivada da decomposição de microrganismos fotossintéticos que foram inativados pelo diuron; porém, essa nova fonte de carbono não favorece especificamente o crescimento de *Aeromonas* spp.

2.3.3 Degradação microbiana do diuron

Sob condições aeróbicas, os microrganismos realizam sucessivas demetilações do grupo uréia, pertencente à molécula de diuron e, posteriormente, a hidrólise, dando origem à anilina clorada (CULLINGTON e WALKER, 1999).

Os fungos de solo têm demonstrado possuir alta atividade em contato com as feniluréias, o que ocasionalmente leva à degradação do diuron (TILLMANN et al., 1978). O diuron transformado pelos fungos, na maioria das vezes, tem degradação incompleta. TIXIER et al. (2000), realizaram estudo quantitativo de biodegradação utilizando três linhagens fúngicas - *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella elegans* e *Mortierella isabellina* - resultados de seleção em que foram escolhidas as mais eficientes para a degradação do diuron. Constatou-se pelo estudo de toxicidade dos derivados do diuron, resultado da N-demetilação do herbicida, que os produtos obtidos da degradação, N-3,4-diclorofenil-N'-metilureia e 3,4-dicloroanilina podem apresentar maior toxicidade aos organismos não-alvo do que o próprio herbicida. A taxa de desaparecimento do herbicida e a formação desses metabólitos dependem do microrganismo utilizado.

VEROUMSIA et al. (1996) selecionaram 90 fungos isolados de solo para estudar a biodegradação de três feniluréias: clorotoluron, diuron e isoproturon. No total, as linhagens degradaram 4%, 7% e 11% de clorotoluron, diuron e isoproturon, respectivamente, em taxa igual ou superior a 50%. Taxas diferenciadas de degradação foram encontradas para diferentes espécies: *Alternaria alternata*, *Pestalotia palmarum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Ascochyta imperfecta* e *Cunninghamella echinulato*. O microrganismo *Rhizoctonia solani* degradou mais de 70% dos três herbicidas e *Sporothrix cyanescens* foi capaz de degradar somente o diuron, em 50%. Em outro trabalho, KHADANI et al. (1999) selecionaram 100 linhagens de micomicetes

(Ascomicetes, Basidiomicetes e Leveduras) do solo, para estudar a biodegradação das três feniluréias (clorotoluron, diuron e isoproturon) e obtiveram 17 linhagens que degradaram o isoproturon acima de 50%: somente quatro para o diuron e duas para o clorotoluron no mesmo nível. Os melhores resultados foram obtidos com a linhagem *Bjerkandera adusta*, que apresentou taxa de degradação de 98% para o clorotoluron, 92% para o diuron e 88% para o isoproturon; a linhagem *Oxysporus* sp, com 76%, 64% e 56% de degradação para os respectivos herbicidas.

WIDEHEM et al. (2002) isolaram e caracterizaram a linhagem de bactéria, *Arthrobacter* sp N2, isolada de solo contaminado com diuron por vários anos, a qual foi capaz de transformar, quantitativamente, diuron em 3,4 dicloroanilina.

Os herbicidas diuron, metalaxil, atrazina e terbutilazina foram submetidos a estudos de biodegradação com nove espécies de fungos de degradação branca, verificando-se correlação significativa e positiva entre a taxa de degradação e os diferentes herbicidas (acima de 90%). As maiores taxas de degradação foram obtidas pelas espécies *Corioleus versicolor*, *Hypholoma fasciculare* e *Stereum hirsutum*. Após 42 dias, a degradação máxima do diuron e terbutilazina foi superior a 86%, e a do metalaxil foi inferior a 44% (BENDING et al., 2002).

A degradação primária do diuron em aerobiose, produz 3,4,-dicloroanilina (3,4,-DCA) e 3',3,4',4-tetracloroazobenzeno (TCAB) (CRIPPS e ROBERTS, 1978; HERNANDEZ et al., 1984). Sob condições de anaerobiose, a remoção da molécula de cloro, na posição *para* do anel aromático, converte o diuron a 3-(3-clorofenil)-1,1-dimetiluréia (ATTAWAY et al., 1982; STEPP et al., 1985).

2.4 PYRITHIOBAC-SODIUM

O pyriithiobac-sodium, sódio 2-cloro-6-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il) tio] benzoato (Figura 2.3), herbicida do grupo pyrimidyl carboxi é utilizado na cultura de algodão, sendo indicado para o controle em pós-emergência precoce de plantas daninhas de folhas largas. Tem como mecanismo de ação a inibição da enzima acetolactato sintetase (ALS) ou acetohidróxido ácido sintetase (AHAS), chave no processo de biossíntese dos aminoácidos vanila, leucina e isoleucina. Esses aminoácidos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, a inibição de sua síntese é letal para várias espécies de plantas (BURGOS et al., 2001). Nas plantas sensíveis, a morte dos tecidos meristemáticos ocorre logo, seguida por necrose lenta acompanhada por leve clorose. A morte completa das plantas daninhas pode demorar algumas semanas (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

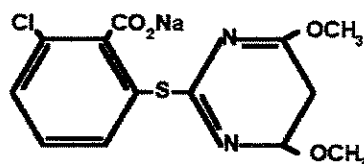


Figura 2.3: Fórmula estrutural do pyriithiobac-sodium.

O pyriithiobac-sodium é fracamente ácido com pK_a de 2,34 e solubilidade de 705 g L^{-1} (2M) a pH 7 (duPont Agricultural Products, 1993). O valor do pK_a representa o pH no qual o grupo funcional carboxil, o sítio ativo do pyriithiobac, tem 50% de probabilidade de ser dissociado em solução aquosa. O pyriithiobac se comporta como um ânion carregado isoladamente em soluções de solo com valores de pH maior que 5 (MATOCHA et al., 1998).

O pyriithiobac-sodium tem baixa adsorção e alta mobilidade no solo, baixa volatilidade e, em exposição contínua, ocorre fotodegradação ficando o produto com meia-vida de uma semana.

A degradação do pyriithiobac no solo ocorre lentamente e, sobretudo, por degradação microbiana, sendo estimada vida média de 60 dias, quando se utiliza a dose recomendada, de 70 a 140 g ha⁻¹ de ingrediente ativo, segundo DuPont Agricultural Products (1993); RODRIGUES e ALMEIDA, 1998; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 2002).

MATOTCHA et al. (1998) estudaram a sorção do pyriithiobac em quatro sorventes diferentes (betonita, caolinita, goetita sintética e turfa de Michigan), que foram empregados para comparação, e quatro tipos de solos provenientes do Texas, com ampla faixa de variação das propriedades físicas e químicas. Foram utilizadas concentrações do herbicida encontradas em campo, e verificou-se que o pyriithiobac foi fortemente sorvido pela turfa, revelando que a fração de matéria orgânica influenciou significativamente na sorção. A caolinita apresentou maior densidade de sorção do que a betonita. O pyriithiobac foi pouco sorvido pelos quatro solos, o que foi atribuído à repulsão do herbicida em solos predominantemente alcalinos e carregados negativamente.

Avaliou-se a mobilidade do pyriithiobac comparando-se com a de traços de bromo (Br⁻), em quatro tipos de solos representativos das regiões onde é plantado algodão, usando colunas intactas para simular condições de campo (MATOTCHA et al., 1999). Os estudos confirmaram a alta mobilidade do herbicida em solos alcalinos e solos carregados predominantemente, com cargas negativas, atestando que a mobilidade do pyriithiobac foi influenciada pelo tipo de solo e pelo processo de fluxo preferencial quando lixiviado através de colunas de solo intactas.

Realizou-se experimento de campo para verificar o efeito de pyriithiobac, levado pelo vento, para plantações de milho e sorgo. A produção de milho foi reduzida na faixa de 11% a 84% e a de sorgo, de 33% a 94%. Essa variação na produção foi dependente do tempo e da dose de pyriithiobac aplicada. Os resultados revelaram que pode ocorrer significativa perda da produção de milho e sorgo que é dependente da

quantidade de vento e do estágio de crescimento dessas plantas (GHOSHEH et al., 2002).

NAIDU et al. (1998) estudaram o metabolismo do pyriithiobac no algodão para determinar a grandeza e natureza do resíduo e estabelecer a trajetória metabólica do herbicida. A concentração de pyriithiobac diminuiu rapidamente nas folhas, de $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, na amostra analisada no dia do tratamento, para $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando a amostra foi coletada com 30 dias do tratamento. Nas folhas coletadas após 62 dias não foi detectado resíduo quantificável de pyriithiobac. Os principais metabólitos identificados nas folhas foram O-desmetil pyriithiobac-sodium (Figura 2.4A) e seu conjugado de glicose (Figura 2.4B). Não se observou evidência de hidroxilação ou clivagem dos anéis de pirimidina e fenil, nem detectado resíduo radioativo na semente de algodão madura e no linter.

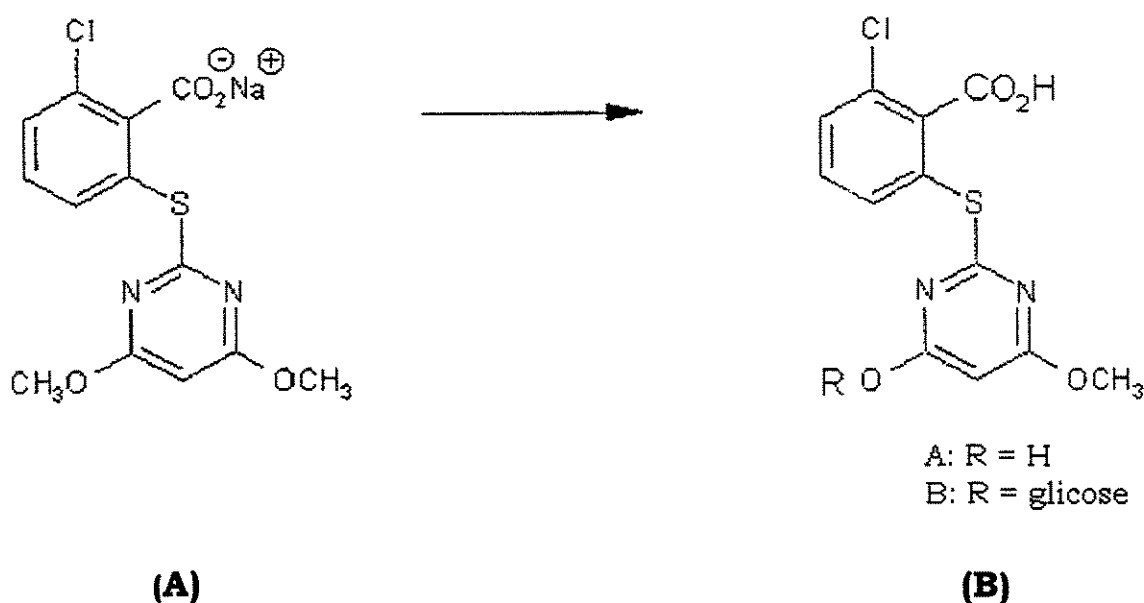


Figura 2.4: Metabólitos do Pyriithiobac-sodium; A. O-desmetil pyriithiobac-sodium; B. conjugado de glicose (DuPont Agricultural Products).

2.5 FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos não fotossintéticos. Com algumas exceções, possuem parede celular, diferentemente das células animais. Esses microrganismos obtêm seu alimento por absorção e não possuem clorofila, formam esporos, que são dispersos por corrente de ar. O Reino Fungi inclui atualmente quatro Filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Outros organismos, tradicionalmente conhecidos como fungos, foram classificados como Protistas e no Reino Stramenopila (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os fungos produzem um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas. Em muitos fungos é conhecido somente o estágio assexuado, chamados fungos imperfeitos ou anamorfos. Os que apresentam o estágio sexuado são chamados fungos perfeitos ou telemorfos. A reprodução assexuada ocorre por meio de brotamento, fragmentação e produção de esporangiósporos ou conídios. A reprodução sexuada culmina na produção de zigósporos, ascósporos ou basidiósporos (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os basidiomicetos, fungos causadores da podridão branca da madeira, têm sido estudados como tipicamente ligninolíticos, por terem a capacidade de degradar substâncias complexas como a lignina, devido à ação de suas enzimas extracelulares, produzidas durante o metabolismo secundário, como consequência da limitação de nutrientes. Esses fungos podem degradar também um amplo espectro de organopoluentes ambientais recalcitrantes, como os agrotóxicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), dioxinas, furanos, etc., constituindo desta maneira, um grupo promissor para aplicação em processos biotecnológicos visando à despoluição ambiental (FRATILA-APACHITEI et al., 1999; REZENDE et al., 2001).

O sistema enzimático extracelular dos basidiomicetos, composto por enzimas como a Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP),

lacase e outras peroxidases, catalizam reações que clivam grande número de compostos tóxicos, devido à alta inespecificidade apresentada por esse sistema. Os compostos tóxicos usualmente não são mineralizados, porém suas transformações em metabólitos menos tóxicos ou não-tóxicos é importante fator para a utilização de microrganismos em processos de biorremediação (KÖLLER et al., 2001).

2.6 ESTRUTURA DA LIGNINA

A lignina é um composto polimérico, formado por unidades de fenilpropano interligadas por ligações alqui-aril, alquil-alquil ou aril-aril, constituindo uma macromolécula irregular, que confere rigidez e forma aos tecidos vegetais. É sintetizada pelas plantas através da catálise de peroxidases. A proporção relativa aos álcoois cinamílicos precursores (cumarílico, coniferílico e sinapílico) varia de acordo com o tecido vegetal, idade, clima e luz solar, etc (KIRK et al., 1981). A figura 2.5 apresenta um modelo de estrutura química da lignina segundo SAKAKABARA (1983) apud LEONOWICZ et al., (1999).

A importância fisiológica da biodegradação da lignina é a destruição da matriz poliaromática, para que os microrganismos tenham acesso aos substratos de real importância à nutrição desses organismos, ou seja, a celulose e hemicelulose (FIELD et al., 1993). Os fungos basidiomicetos, causadores da decomposição branca, têm sido intensivamente estudados por serem tipicamente ligninolíticos e constituírem grupo promissor para a aplicação na biorremediação de xenobióticos (GLENN e GOLD, 1983; FIELD et al., (1993); HIGUCHI, 1990; RODRIGUEZ et al., 1998).

Entretanto, outros microrganismos produtores de enzimas ligninolíticas, como ascomicetos, fungos de solo, actinomiceto e algumas bactérias (DEKKER et al., 2001) também devem ser investigados.

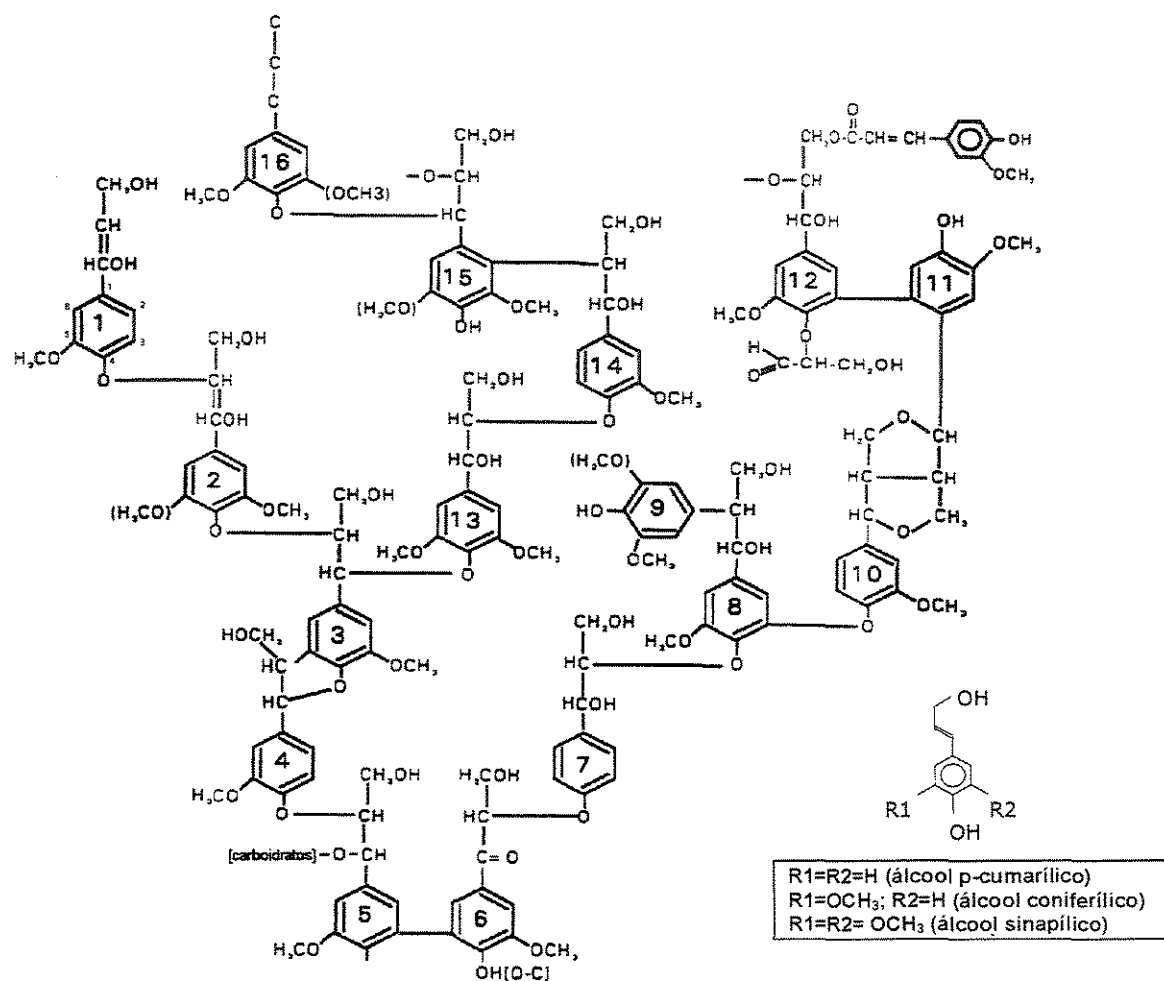


Figura 2.5: Estrutura química provável da lignina (LEE, 1997).

2.7 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E MICRORGANISMOS PRODUTORES

Vários são os microrganismos descritos na literatura que possuem a habilidade de degradar compostos poluentes e recalcitrantes, encontrados no ambiente, sendo os mais estudados os fungos de decomposição branca (BAVUTTI, 2002). A degradação da lignina por

fungos basidiomicetos é considerada um processo oxidativo não-específico, pela ação das enzimas lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e outras peroxidases, as quais dependem do peróxido de hidrogênio, ou da lacase, que por sua vez, é dependente de moléculas de oxigênio (KIRK e FARREL, 1987).

Existem vários exemplos de fungos basidiomicetos degradadores de lignina: *Phanerochaete sordida*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes hirsuta*, *Fumaria gallica*, *Phlebia brevipora*, entre outros. No entanto, o fungo *Phanerochaete chrysosporium* tem sido modelo para o estudo de eucariotos ligninolíticos, por sua habilidade em degradar poluentes, o qual está relacionado com sua capacidade em degradar a lignina, um polímero vegetal que resiste à metabolização por diferentes microrganismos (REZENDE, 2002; MATHIAS et al., 1995).

Por ser uma macromolécula insolúvel, os passos iniciais da biodegradação devem ser extracelulares. A etapa final da mineralização da lignina é realizada no interior das hifas fúngicas; portanto, as reações extracelulares devem “quebrar” a lignina em fragmentos pequenos capazes de se difundir através das hifas e cruzar as membranas celulares. Evidências químicas e fisiológicas mostram que a degradação da lignina, bem como sua biossíntese são, predominantemente, oxidativas, embora reações de redução possam, também participar desses processos (CHEN e CHANG, 1985; BAVUTTI, 2002).

As diferenças estruturais e químicas no substrato não-homogêneo da lignina conduzem à especialização na produção das enzimas ligninolíticas pelos microrganismos capazes de degradá-las. De acordo com a produção dessas enzimas, os fungos de decomposição branca são divididos em cinco grupos (TOUR et al., 1995; CLEMENTE et al., 2001; CLEMENTE, 2002).

1. Fungos produtores de LiP, MnP e lacase, ex. *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolos vesicolor* e *Phlebia radiata*. O *Phanerochaete chrysosporium* está neste grupo desde que a

produção de lacase foi reportada (ANDER et al., 1980; ERIKSOON et al., 1983). Entretanto, esse fungo não é considerado produtor de lacase. Todos colonizam madeiras decíduas, e somente *P. radiata* degrada coníferas.

2. Fungos produtores de MnP e lacase, não secretam níveis detectáveis de LiP. São potentes degradadores de lignina, ex. *Dichomitus squalens* e o fungo comestível *Lentinula edodes* pertencem a esse grupo.
3. Fungos produtores de LiP e um tipo de fenoloxidase, sendo a lacase a fenoloxidase mais produzida. Colonizam madeira dura, exceto a *Phlebia tremellosus*, que também degrada coníferas.
4. Fungos produtores apenas de LiP são degradadores de madeiras duras. Ex. *Bjerkandera adusta*, *Daedaleopsis confragosa*, *Phallus impudicus* e *Polyporus varius*.
5. Os fungos do último grupo não possuem o sistema enzimático completamente caracterizado. *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, sobretudo LiP, envolvem, provavelmente, diferentes mediadores, opostos aos fungos que secretam MnP e lacase. Os fungos também podem expressar diferentes produções de enzimas em culturas agitadas e estacionárias (TOUR et al., 1995).

O grupo das enzimas fenoloxidases inclui, principalmente, três tipos de enzimas: peroxidases, lacases 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 desses compostos (SZKLARZ et al., 1989).

2.7.1 Peroxidases

As peroxidases são hemoproteínas, produzidas principalmente por microrganismos e plantas, as quais catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio. Podem ser dependentes ou não do manganês presente no meio (SZKLARZ et al., 1989) e desempenham papel importante durante a degradação da lignina, diminuindo a concentração de peróxido de hidrogênio do meio, evitando assim a toxicidade para a célula (SZKLARZ e LEONOWICZ, 1986).

Lignina-peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

Anteriormente conhecida como ligninase, é uma heme peroxidase com alto potencial redox e pH ótimo de atividade baixa. É capaz de oxidar anéis aromáticos metoxilados sem a presença de um grupo fenólico livre, gerando radicais catiônicos que podem reagir posteriormente por diferentes vias metabólicas, incluindo o rompimento de ligação C α -C β , com conseqüente ruptura do anel aromático (BONNEN et al., 1994).

Essa enzima foi isolada por TIEN e KIRK (1983) e por GLENN et al., (1983), trabalhando independentemente. É uma glicoproteína, contendo 20% a 30% de açúcar, ferro como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (HATKKA, 1994; REDDY e D'SOUZA, 1994). A LiP é produzida por quase todos os fungos de decomposição branca. Juntamente com outras enzimas, é considerada a maior constituinte do sistema que degrada lignina em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN et al., 1983; TIEN e 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 sua produção regulada geneticamente em condições limitantes de nitrogênio e carbono. Sua produção ocorre durante o metabolismo secundário, em resposta à falta desses nutrientes. Na presença de tais nutrientes, ocorre completa repressão de sua síntese (REDDY, 1993; REDDY e D'SOUZA, 1994).

A LiP catalisa grande variedade de compostos modelos de lignina e poluentes aromáticos, na presença de H_2O_2 (BUSWELL e ODIER, 1987; HIGUCHI, 1990; VALLI e GOLD, 1991). Essas reações incluem oxidação do álcool benzílico, quebra das cadeias laterais, reações de abertura de anéis aromáticos, demetilações e desclorações oxidativas. Todas essas reações são compatíveis com o mecanismo envolvido na degradação não-específica desta enzima (RENGANATHAN e GOLD, 1986; KIRK e FARREL, 1987).

O mecanismo de atuação da LiP se dá através de oxidação pela abstração de um elétron da molécula de lignina e compostos semelhantes à sua estrutura, resultando na formação de radicais catiônicos (Figura 2.6). Posteriormente, através de uma série de reações não-enzimáticas, os radicais dão origem a uma variedade de produtos finais (HIGUCHI, 1990; REDDY e D'SOUZA, 1994).

O álcool veratrílico, metabólito produzido por diversos fungos de decomposição branca sob condições ligninolíticas, desempenha papel importante no ciclo catalítico dessa enzima. Atua como agente redutor da enzima e, aparentemente, a protege da inativação por excesso de H_2O_2 (TIEN e KIRK, 1983; WARIISHI e GOLD, 1990; FIELD et al., 1993).

Atualmente, existe interesse crescente no estudo dessa 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 importante papel na descontaminação de efluentes e solo (CAMERON et al., 2000).

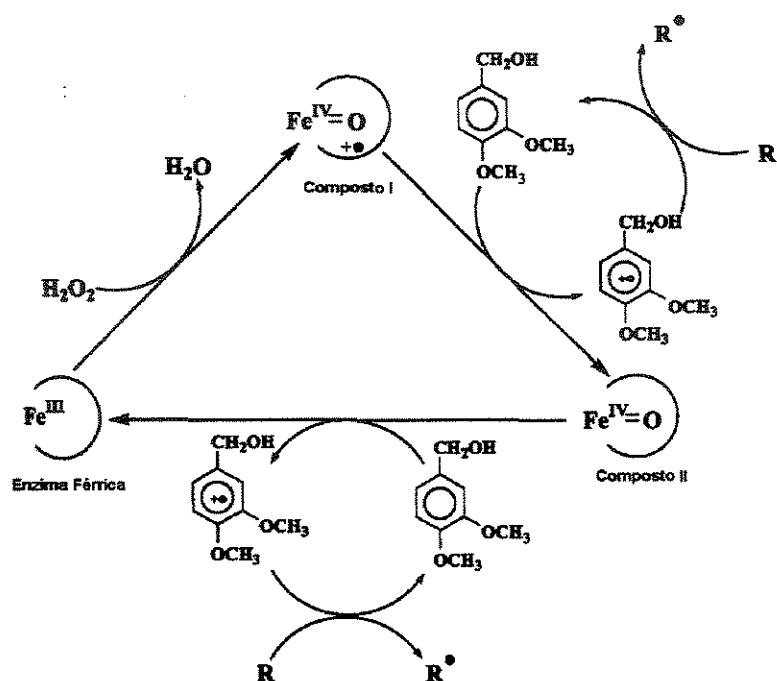


Figura 2.6: Ciclo catalítico da lignina peroxidase (CAMERON et al., 2000).

Mangânês-peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13)

Essa enzima é outra heme peroxidase, porém com alta especificidade por Mn (II) como seu substrato redutor (GLENN e GOLD, 1985). O íon Mn (III) forma um complexo com ácidos orgânicos que se difunde oxidando outros materiais. O potencial redox dessa enzima é menor do que o da lignina peroxidase e, conseqüentemente, pode não oxidar modelos de lignina não-fenólicos. Os substratos fenólicos são oxidados a radicais fenóxi, que podem reagir, posteriormente, por desmetilação, clivagem da ligação alquil-fenil, clivagem da ligação C_α - C_β , ou ainda oxidação do C_α (REID, 1995). O peróxido de hidrogênio produzido

pode ser utilizado como co-substrato para a LiP e outras peroxidases oxidando compostos modelo de lignina (PASZCZYNSKI et al., 1985).

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

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

A oxidação de lignina e outros compostos fenólicos por MnP é dependente de íons de manganês (GLENN e GOLD, 1985; PASZCZYNSKY et al., 1985; GOLD et al., 1989). Como mostrado na figura 2.7, a redução primária do substrato no ciclo catalítico de MnP é Mn (II), que eficientemente reduz os compostos I e II, gerando Mn (III), que oxida o substrato orgânico. Ácidos orgânicos, como oxalato e malonato, são secretados por *Phanerochaete chrysosporium* (WARIISH et al., 1992), estimulam a reação de MnP por estabilizar Mn (III) e, assim, podem difundir-se para catalisar a oxidação via um elétron de compostos fenólicos, gerando radicais fenóx (GLENN e GOLD, 1985; GLENN et al., 1986; GOLD et al., 1989; WARIISH et al., 1989; WARIISH et al., 1992).

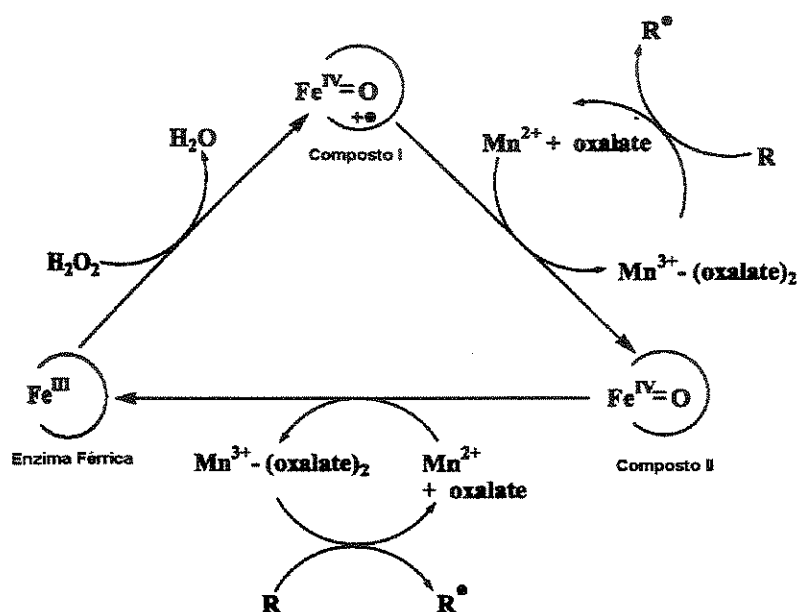


Figura 2.7: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (CAMERON et al., 2000).

2.7.2 Polifenol oxidases (Fenoloxidasases)

As fenoloxidasases são oxiredutases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, subdivididas em duas classes - tirosinases e lacases - e ambas reagem com oxigênio (JOVILET et al., 1998; CHEVALIER et al., 1999). São capazes de transformar compostos aromáticos, metabólitos da degradação de lignina e taninos (TAGGER et al, 1998).

As fenoloxidasases possuem também a capacidade de polimerizar os monômeros resultantes da degradação da lignina, propriedade utilizada à polimerização de polifenóis na síntese de compostos orgânicos. Essas

enzimas são aplicadas na destoxificação ambiental e no biobranqueamento de efluente nas indústrias de polpa e papel (TAGGER et al., 1998).

Lacase (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase EC 1.10.3.2)

A lacase é uma polifenoloxidase descoberta em exsudatos 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_2O_2 para sua atividade, e catalisa a redução de O_2 para H_2O (Figura 2.8) (THURSTON, 1994). Essa enzima é produzida por todos os fungos de decomposição branca (SZKLARZ et al., 1989), com exceção de *P. chrysosporium* (KIRK e 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, e a forma induzida geralmente apresenta maior atividade (LEONOWICZ et al., 1985).

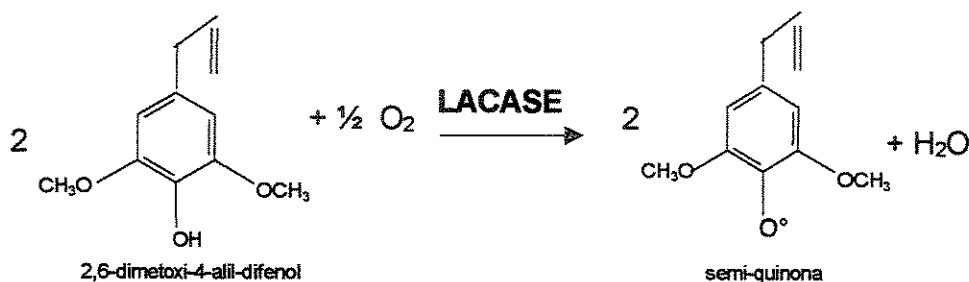


Figura 2.8: Mecanismo de oxidação proposto para Lacase (SUGUMARAN e BOLTON, 1998).

Em geral, a lacase apresenta quatro átomos de cobre, distribuídos em diferentes sítios de ligação e classificados em três tipos: cobre tipo 1, 2, 3 sendo diferenciados por propriedades específicas, com importante papel no mecanismo catalítico da enzima (McGUIRL e DOOLEY, 1999). De acordo com CALL e MÜCKE (1997), o cobre 1 e o 2 estão envolvidos na captura e transferência do elétron. O cobre 2 e o 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, deslignificação de polpa, descontaminação de solos e águas poluídas (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 diversos substratos, inclusive em vários pHs. Algumas lacases apresentam pH ótimo entre 2,5-3,5, enquanto outras mostram atividade ótima em pH neutro, 6-7, (RINGLING e VAN ALFEN, 1993). A função fisiológica dessa enzima não é clara e seu papel na biodegradação da lignina é incerto, uma vez que pode causar polimerização da lignina, dependendo das condições (GOLD e ALIC, 1993; THURSTON, 1994). Assim, propôs-se que a lacase tem 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 e RENGANATHAN, 1995).

2.7.3 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 capazes de gerar H_2O_2 , presumivelmente, para utilizar emperoxidases extracelulares durante a degradação da macromolécula de lignina.

Uma das enzimas que geram H_2O_2 é intracelular e idiofásica: aril álcool oxigenase (AAO). Essa enzima oxida álcoois aromáticos para aldeídos e esses a ácidos, com simultânea redução de O_2 para H_2O_2 em culturas de fungos de degradação branca: *T. versicolor*, *P. sajor-caju*, *P. ostrearius*, *P. eryngii* e *B. adusta* (de JONG et al., 1994; EVANS et al., 1994).

AAO não é o único sistema enzimático de fungos de decomposição branca disponível para produzir H_2O_2 extracelular. Outras oxidases extracelulares e intracelulares são conhecidas por fornecerem H_2O_2 . A enzima extracelular glioxal-oxidase é produtora de H_2O_2 (GOLD e 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-l-oxidase, piranose-oxidase, metanol-oxidase e acil-COA-oxidase (GREENE e GOULD, 1984; KELLEY e REDDY, 1988; VOLC e ERIKSSON, 1988, ERIKSSON e NISHIDA, 1988; VOLC et al., 1991).

A enzima álcool veratrílico-oxidase também parece estar envolvida na produção de H_2O_2 , além de prevenir a 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).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 HERBICIDAS UTILIZADOS

Os herbicidas utilizados foram Diuron 500SC na formulação de suspensão concentrada com 500 g L⁻¹ de ingrediente ativo, cedido pela empresa Millenia Agro Ciência S.A., Londrina (PR), e Pyriithiobac-sodium na formulação concentrado solúvel com 280 g L⁻¹ de ingrediente ativo, nome comercial Staple 280CS, cedido pela empresa IHARABRAS S.A., Sorocaba (SP). Estas empresas forneceram também o padrão diuron com 98,10% de pureza e o padrão pyriithiobac-sodium com 98,6% de pureza

3.2 EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO

Os experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação do Centro de Grãos e Fibras do Instituto Agrônomo de Campinas, IAC. Utilizou-se dois tipos de solos, arenoso e argiloso, provenientes das Estações Experimentais do IAC, localizadas, respectivamente, em Pindorama e Ribeirão Preto (SP).

O solo foi coletado até uma profundidade de 20 cm com pá reta, tomando-se o cuidado, em cada ponto de coleta, afastar com pé os detritos, evitando pontos próximos a cupinzeiros, formigueiros, casas, estradas, estrume, depósitos de adubo ou manchas no solo (RAIJ et al., 1996). Amostras de 300 g de terra foram transferidas para caixas de papelão, visando a posterior análises de solo. A análise de fertilidade de cada solo é apresentada na tabela 3.1.

Os solos foram secos ao ar, peneirados e, após os resultados das análises de fertilidade, adubados, segundo recomendação de SILVA (1996), e colocados em vasos de alumínio. O solo de Ribeirão Preto, proveniente de área agrícola, e os dois de Pindorama, extraídos de mata e pastagem, não precisaram ser corrigidos devido ao nível de saturação de bases para

ambos os solos ser superior a 60%, nível considerado adequado para a cultura do algodoeiro.

As adubações fosfatada e potássica foram feitas de acordo com a necessidade da cultura de algodoeiro, segundo a recomendação de SILVA (1996).

Tabela 3.1: Análise de fertilidade do solo de amostras coletadas na camada de 0-20 cm, nas estações experimentais do IAC, localizadas em Ribeirão Preto e Pindorama

Local		P	Matéria	pH	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	H ⁺ Al ⁺³	SB	CTC	V
		Mg dm ⁻³	Orgânica g dm ⁻³	CaCl ₂	cmolc dm ⁻³						%
Pindorama (arenoso)	Diuron	25	10,0	5,6	0,23	1,8	0,8	1,4	2,83	4,23	66,90
	Pyrithiobac-sodium	26	31,0	5,8	0,32	5,3	1,2	1,6	6,82	8,42	81,00
Ribeirão Preto (argiloso)	Diuron	23	38,0	5,1	0,19	4,6	1,5	4,0	6,29	10,29	61,13
	Pyrithiobac-sodium	18	36,0	5,3	0,16	6,7	1,6	4,0	8,46	12,46	67,90

P-fósforo; K⁺-potássio; Ca⁺²- cálcio; Mg⁺-magnésio; H⁺Al⁺³- acidez total; SB- soma de bases; CTC- capacidade de troca de cátions; V- saturação de bases.

O solo adubado foi colocado em vasos, irrigado e semeadas dez sementes de algodão *Gossipium hirsuntum* (variedade IAC 23) em cada vaso. Oito dias após a germinação, foi feito o desbaste permanecendo três plantas por vaso.

Nesse experimento, foram avaliados os efeitos dos herbicidas diuron e pyrithiobac-sodium sobre a população de microrganismos presentes em tais solos. Os produtos foram aplicados com pulverizador costal a pressão constante de 2 kgf cm⁻² à base de CO₂, dotado de barra com quatro bicos do tipo leque. Os herbicidas foram aplicados nas doses indicadas para a cultura do algodoeiro e em, duas, quatro e oito vezes a

dosagem recomendada, sendo incluído também, tratamento-testemunha. Na tabela 3.2 são apresentadas as doses aplicadas de cada herbicida.

Tabela 3.2: Doses aplicadas de diuron e pyriithiobac-sodium em experimento com solo argiloso e arenoso

Herbicida	0	X	2X	4X	8X
Diuron (L ha ⁻¹)	0	2,4	4,8	9,6	19,2
Pyriithiobac-sodium (mL ha ⁻¹)	0	0,25	0,50	1,0	2,0

O diuron foi aplicado em pré-emergência no dia seguinte à semeadura e o pyriithiobac-sodium, em pós-emergência da cultura algodoeira, quando as plantas apresentaram quatro folhas verdadeiras. Os vasos foram dispostos em delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições e cinco tratamentos para o solo argiloso, e cinco repetições e cinco tratamentos para o arenoso, sendo cada parcela constituída por um vaso.

Antes e logo após a aplicação dos produtos, bem como periodicamente, realizaram-se amostragens dos solos. Para o experimento com diuron, as amostras foram coletadas a cada catorze dias até 135 dias; para o experimento com o pyriithiobac-sodium, a coleta foi a cada sete dias até 70 dias.

3.3 ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS MICRORGANISMOS DURANTE O EXPERIMENTO NA CASA DE VEGETAÇÃO

A cada catorze dias para o diuron e sete dias para o pyriithiobac – sodium, foram coletados 30 g de solos de cada tratamento, peneirados em malhas de 2 mm, homogeneizados e colocados em sacos plásticos. Sub-amostras de 1 g foram retiradas para quantificar a população de

microrganismos presentes no solo e, subamostras de 10 cm³ foram retiradas para realizar as determinações de pH.

Para a contagem de microrganismos, 1 g de amostra dos solos, previamente tratados com herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium, foi adicionado a 9,0 mL de água destilada esterilizada. A suspensão de solo foi submetida à agitação de 4,92 x g e após uma hora foram realizadas diluições sucessivas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), das quais tomadas alíquotas de 100 µl para inoculação nos meios de cultivo apropriados para bactérias, fungos e actinomicetos. No intuito de aumentar a precisão das contagens, duas placas por diluição foram submetidas à inoculação. As placas foram incubadas na posição invertida a 30 °C por dois dias para as bactérias, cinco dias para os fungos e dez dias para os actinomicetos. Após esses dias de incubação foi realizada a contagem dos microrganismos. Os fungos crescidos nas placas com a maior concentração de herbicida, oito vezes à concentração do campo, foram isolados para testes posteriores de degradação. As medidas de pH foram realizadas como descritas abaixo, segundo método desenvolvido por RAIJ et al. (1987).

- 1- Transferir 10 cm³ de terra para frasco plástico de 80 mL.
- 2- Adicionar 25 mL de solução de CaCl₂ 0,01M e aguardar 15 minutos para o molhamento completo da amostra.
- 3- Agitar durante cinco minutos em agitador com hélices individuais
- 4- Calibrar o aparelho com as soluções-tampão de pH 7,0 e 4,0.
- 5- Após um período de 30 minutos, necessário para o equilíbrio e decantação da suspensão, ler sem agitação o pH em CaCl₂ 0,01M, tomando-se o cuidado de encostar o bulbo do eletrodo de vidro no sedimento; o eletrodo de referência deve permanecer no sobrenadante, porém com a ponta salina imersa.

Os meios utilizados para inocular os microrganismos foram: Plate Count Agar (PCA) para bactérias, Batata Dextrose Agar (BDA) mais

antibiótico tetraciclina para fungos e Meio Ágar Mineral com adição do antifúngico ciclohexamida LABEDA e SHEARER, (1990) para actinomicetos descrito na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Composição do Meio Ágar Mineral para actinomicetos, pH final de 7,3 em 1.000 mL de água destilada

Composto	Concentração (g)
KNO ₃	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄	0,5
NaCL	0,5
FeSO ₄	0,01
Agar difco 1,5%	20,0
Microelementos	1,0 mL
Microelementos	
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,0
MnCl ₂ .2H ₂ O	1,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,24

Os meios citados acima foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos e adicionado 1 mL do antibiótico tetraciclina (0,1%), previamente esterilizado em membrana millipore (0,22 µm), para cada 100 mL de meio BDA; e 50 µg mL⁻¹ do antifúngico ciclohexamida (actidiona 0,1%) no meio ágar mineral.

Durante o período de incubação, os fungos isolados de solo foram transferidos para placas de BDA-Difco para purificação dos isolados. Todas as culturas foram mantidas em tubos inclinados contendo BDA-Difco e, antes de qualquer teste, reativadas por inoculação em placas e incubadas em meio BDA-Difco por cinco dias.

3.4 TRIAGEM DOS ISOLADOS FÚNGICOS DO SOLO COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM

Os fungos isolados do solo foram testados quanto a sua resistência à aplicação de alta dose dos herbicidas diuron ($3325 \mu\text{g mL}^{-1}$) e pyrithiobac-sodium ($217,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foram utilizadas placas com o meio BDA-difco, onde foram feitos quatro poços com dimensões iguais, sendo o herbicida adicionado nos poços e, no centro da placa foi inoculado o fungo. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 30°C por sete a dez dias. Os resultados do crescimento foram comparados com o crescimento em placas-controle sem a adição de herbicida.

3.5 SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNINOLÍTICOS

Foram também utilizadas 24 linhagens de fungos da classe de basidiomicetos pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Utilizaram-se as seguintes linhagens: *Pleurotus ostreatus* (POS 98/33, origem São Roque), *Pleurotus ostreatus* (POS 98/37, origem São Paulo), *Pleurotus ostreatus* (POS 98/36, origem Brasília) e *Pleurotus sajor – caju* (PSC 94/03), doadas pela área de Biotecnologia e Microbiologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu – SP; *Pleurotus ostreatusroseus* Sing. (CCB 016), origem São Paulo); *Pleurotus* sp (CCB 068), origem Mogi das Cruzes; *Pleurotus flabellatus* (CCB 394), origem Ribeirão Grande; *Pleurotus cf flabelatus* (CCB 396), origem Ribeirão Grande, *Pleurotus* sp (CCB 507), origem Ribeirão Pires; *Pleurotus* sp (CCB 517), origem Ilha do Cardoso; *Pleurotus* sp “Florida” (CCB 001); *Pleurotus ostreatusroseus* (CCB 440), doadas pela Coleção de Culturas de Basidiomicetos da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de

Botânica; *Pleurotus* sp (origem Tailândia), doada pelo Departamento de Fitopatologia da Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – Campus de Piracicaba – SP; *Pleurotus* sp Florida (BPF sp), *Pleurotus* sp 016 (BSC 016); *Pleurotus* sp P1 (BPP1); *Pleurotus ostreatus* (BPO); *Pleurotus sajor – caju* 020 (BPSC 20); *Pleurotus sajor – caju* 020 (BPSC 020M); *Agaricus campestris*, shimej (BS); *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (BPC); *Lentinus edodes* (shiitake MP 310); (BMSP 310), *Lentinus edodes* (shiitake MOA) (BSMOA) e H2 (BH 2).

3.6 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

As linhagens foram conservadas em câmara fria a 16 °C, em tubos inclinados contendo meio batata-dextrose- ágar (BDA – difco).

As linhagens foram reativadas em placa de Petri com meio BDA, incubadas durante sete dias em estufa a 30 °C, obtendo-se dessa maneira o máximo crescimento micelial.

3.7 SELEÇÃO DAS LINHAGENS EM MEIO SÓLIDO

Para a seleção das melhores linhagens da classe de Basidiomicetos, realizou-se teste de crescimento e resistência com níveis crescentes de concentrações dos herbicidas. Nesse experimento foram utilizados os herbicidas comerciais Diuron 500 SC e pyriithiobac-sodium (Staple 280CS), no meio base de sais com a adição de 1,5% de ágar, como mostra a tabela 3.4.

O pH do meio foi ajustado para 5,0, sendo esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização, adicionou-se 1,0 mL da vitamina tiamina a 0,1% para cada 1.000 mL de meio-base.

Nos tubos com 20 mL do meio líquido base, adicionaram-se diferentes concentrações dos herbicidas. Para o diuron, com dosagem comercial de 2,4 L ha⁻¹, utilizaram concentrações de 33,25 µg mL⁻¹

(corresponde a 1X a dose de campo), 332,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (10X) e 3.325 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100X) e para o pyriithiobac-sodium, cuja dosagem comercial foi de 250 mL .ha⁻¹ utilizaram-se as concentrações de 2,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (corresponde a 1X a dose de campo), 21,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (10X) e 217,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (100X).

Tabela 3.4: Composição do meio líquido base em 1.000 mL de água destilada

Composição	Concentração (g)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,8
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,004
MnSO ₄	0,005
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,055
Extrato de levedura	0,2

Os meios com as diferentes concentrações dos herbicidas foram vertidos em placas de Petri e, após solidificação, cortados em quadrados de 1,0 cm x 1,0 cm.

Foram preparadas, também, placas contendo somente o meio BDA, inoculando-se no centro, os fungos e nas extremidades, colocando-se três quadrados retirados das placas contendo meio BDA e o herbicida (1,0 cm x 1,0 cm), eqüidistantes sobre a superfície. As placas foram colocadas em estufa a 30 °C, sendo avaliadas diariamente durante sete dias. Foram utilizadas placas-controle sem adição do herbicida para cada linhagem.

Para a classificação dos microrganismos resistentes aos herbicidas, foi necessário que não se observasse o desenvolvimento de zonas de inibição em volta dos quadrados.

Após a padronização, todas as linhagens de basidiomicetos foram testadas quanto a sua resistência de crescimento em relação aos

herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium. As linhagens que apresentaram zona de inibição foram descartadas.

3.8 EXPERIMENTOS DE BIODEGRADABILIDADE DO DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM

3.8.1 Microrganismos selecionados

Os fungos utilizados neste experimento resultaram da seleção realizada com os Basidiomicetos da coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da UNICAMP, e isolados de solo. Foram avaliados cinco Basidiomicetos: *Pleurotus* sp (CCB 507); *Agaricus campestris*; *Phanerochaete chrysosporium*; *Pleurotus* sp (CCB 068) e *Pleurotus* sp (016); e oito fungos isolados de solo: DP24e, DP24o, DRP02n, DRP02e, SP16a, SRP17g, SRP17c, SRP20e, quanto à capacidade de produzirem enzimas do sistema ligninolítico utilizando-se os herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium como substratos. Esses fungos foram testados também quanto à degradação produzida. Selecionaram-se os fungos com maior capacidade de produzir enzimas ligninolíticas e degradar os respectivos herbicidas.

Os fungos foram mantidos em câmara fria a 16 °C, em tubos inclinados contendo ágar-batata-dextrose (BDA-Difco). O crescimento dos fungos foi acompanhado em placas de Petri com BDA e mantidos em estufa a 30 °C, pelo período de oito a dez dias, quando atingiu o máximo crescimento micelial.

Obteve-se o inóculo das placas de Petri com meio BDA, onde o ágar contendo o micélio foi quadriculado 1,0 cm x 1,0 cm ou 5 (1,0 cm x 1,0 cm), retirado das placas e inoculado em meio líquido CLEMENTE (2001). O crescimento foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido base (como descrito na tabela 3.4). O pH do meio foi ajustado com ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹) para 5,0.

Os fungos foram incubados sob condição estacionária em estufa a 30 °C por um período de três dias. No terceiro dia de crescimento, adicionaram-se os herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium, nas concentrações de 25 µg mL⁻¹ e 10 µg mL⁻¹ respectivamente. Após a adição dos herbicidas, as amostras foram coletadas com 3, 7, 10 e 14 dias de crescimento e, imediatamente após a coleta, fez-se a leitura do pH. As amostras foram centrifugadas a 31.483 xg, a 4 °C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, reservados em frascos e mantidos em *freezer* para posteriores análises enzimáticas e de degradação. Os experimentos foram realizados em duplicatas e frascos sem inóculo, utilizados como controle abiótico.

3.8.2 Preparo das soluções-estoque

As soluções-estoque dos herbicidas foram preparadas segundo o método de SILVA et al. (2000) que consta:

- Separar o material necessário, escolhendo o balão volumétrico adequado;
- Limpar a vidraria, verificar a solubilidade do soluto no solvente desejado;
- Calcular a massa de soluto necessária, verificando a pureza do soluto;
- Pesar a massa de soluto real (m_1') em uma funil de pesagem, utilizando espátula de inox para transferência do soluto, em balança analítica devidamente calibrada;
- Colocar o funil de pesagem sobre o balão volumétrico, tomando cuidado para que não haja perda de material;
- Gotejar o solvente da solução com pipeta Pasteur sobre o soluto no pesa-filtro, de modo que o soluto seja totalmente transferido para o balão volumétrico;

$$C = m_1/V$$

em que:

C = concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$;

m_1 = massa do soluto em mg;

V = volume da solução em mL

Cálculo da massa real de soluto:

$$m_1' = m_1 * 100 / \% \text{pureza}$$

m_1' = massa do soluto real;

m_1 = massa do soluto ideal;

% pureza = pureza do soluto em porcentagem.

- Agitar para que o soluto seja dissolvido. Completar o volume até o menisco do balão volumétrico. Tampar e agitar novamente para homogeneização da solução;
- As soluções para a curva de calibração serão preparadas a partir de diluições da solução-estoque.

3.9 DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

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

$$[(A/\epsilon)/(R \times t)] \times 10^6 = U/L.min$$

em que:

A = absorvância (Δ Abs)

ϵ = coeficiente de absorção molar

R = quantidade de caldo enzimático (mL)

(t) = tempo de reação em minutos.

U = unidades

3.9.1 Lignina Peroxidase (LiP) (E.C.1.11.1.7)

Essa atividade foi determinada segundo TIEN e KIRK (1983), pela oxidação do álcool veratríl. A mistura da reação foi composta de 0,6 mL do sobrenadante; 0,2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,0 mmol L^{-1} ; 0,2 mL de álcool veratríl 2,0 mmol L^{-1} em tampão tartarato de sódio 0,4 mol L^{-1} (pH 3,0).

Iniciou-se a reação pela adição de (H_2O_2) e o aparecimento do aldeído veratríl ($\xi_{310} = 9.300 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), determinado lendo-se a absorbância a 310 nm. Essa atividade foi expressa em $\text{U L}^{-1} \text{min}^{-1}$.

3.9.2 Manganês Peroxidase (MnP) (E.C.1.11.1.13)

Essa atividade foi quantificada segundo KUWAHARA et al. (1984), através da oxidação do vermelho de fenol ($\xi_{610} = 4.460 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), na presença de manganês e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A mistura da reação foi composta de 0,5 mL do sobrenadante; 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 mol L^{-1} ; 0,05 mL de MnSO_4 2,0 mmol L^{-1} ; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,05 de H_2O_2 em tampão succinato de sódio 0,2 mol L^{-1} (pH 4,5).

A mistura foi incubada a 30 °C por 5 minutos e a reação, interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. A absorbância foi lida em 610 nm e essa atividade expressa em $\text{U L}^{-1} \text{min}^{-1}$.

3.9.3 Lacase (E.C.1.10.3.2)

Para se determinar essa atividade 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 mol L^{-1} (pH 5,0); 0,1 mL de siringaldazine (0,1% em etanol); 0,1 mL de água destilada (SZKLARZ et al., 1989 – modificada).

A oxidação da siringaldazine ($\xi_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) até sua forma quinona foi acompanhada durante dez minutos a 525 nm. A atividade foi expressa em $\text{U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.9.4 Peroxidase (E.C.1.11.1.7.)

Essa atividade foi determinada da mesma forma que a lacase, exceto pela introdução de 0,1 mL de H_2O_2 exógeno no meio da reação no lugar da água destilada. Foi também utilizado como substrato siringaldazine (SZKLARZ et al., 1989 - modificada). A atividade foi expressa em $\text{U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Foram realizadas, durante o estudo da biodegradação dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium, determinações em duplicata da atividade das enzimas ligninolíticas.

3.10 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As determinações de degradação foram realizadas com os sobrenadantes das amostras coletadas com 3, 7, 10, e 14 dias de crescimento. Para quantificar a degradação dos herbicidas presentes nos sobrenadantes das culturas, realizou-se a análise cromatográfica.

A fim de determinar a degradação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um cromatógrafo da marca WATERS, utilizou-se coluna com fase reversa C_{18} Varian, detector UV visível 486. O volume injetado foi de 10 μL , e utilizou-se um sistema isocrático de solventes como fase móvel, constituído de metanol/água na proporção 70/30 (v/v) para o diuron, na vazão de 0,7 mL min^{-1} (ESPOSITO et al, 1998); utilizou-se para o pyriithiobac-sodium acetonitrila/tampão fosfato de potássio 43/57 (v/v) 30 mM, pH 3,0, na vazão de 0,8 mL min^{-1} em temperatura de

40 °C (SUMPTER e PETERSON, 1994). O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm para ambos os herbicidas.

Para o cálculo da porcentagem de degradação, utilizou-se a curva de calibração, que compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas dessa mesma substância em soluções-padrão de concentrações conhecidas. Várias soluções da substância a ser quantificada foram preparadas em concentrações crescentes; obtendo-se o cromatograma correspondente a cada uma delas; em um gráfico e relacionando as áreas obtidas com as concentrações (BONATO, 1997).

As curvas de calibração foram obtidas com soluções-padrão de diuron e pyriithiobac-sodium.

- **Diuron**

Para realizar as curvas foram utilizados duplicatas das concentrações: 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foram obtidas para cada determinação analítica.

- **Pyriithiobac-sodium**

A curva de calibração para esse composto foi obtida, também, utilizando duplicatas das concentrações: 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foram obtidas para cada determinação analítica.

3.11 DEGRADAÇÃO DO DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM UTILIZANDO OS INÓCULOS SELECIONADOS

As linhagens *Pleurotus* sp (CCB068), *Pleurotus* sp (BCCB507), SRP17c e *Agaricus campestris* foram submetidas ao teste de porcentagem de degradação e formação de biomassa fúngica, utilizando concentrações mais elevadas dos dois herbicidas.

O crescimento foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido base (como descrito na tabela 3.4). O pH do meio foi ajustado com ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) para 5,0.

Os herbicidas foram adicionados no 3.^o dia de cultivo nas concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o diuron e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o pyriithiobac-sodium. As amostras foram retiradas em intervalos de três dias até o 15.^o dia e, depois a cada cinco dias, totalizando um período de 30 dias de cultivo.

3.12 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA

A formação de biomassa foi monitorada mediante a determinação do aumento da proteína micelial, conforme descrito por MESSNER e KUBICEK (1991). As culturas foram incubadas conforme descrito no item 3.11, sendo o tempo zero correspondente aos frascos coletados, imediatamente após a adição de cada herbicida.

Dessa maneira, o micélio foi lavado com água e centrifugado a 35.541 xg a uma temperatura de 4°C por 15 minutos, sendo a água de lavagem descartada e adicionados 5 mL de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), homogeneizando a massa fúngica em sonicador a 4°C por cinco minutos.

Após esse procedimento, a suspensão foi centrifugada em Eppendorf e a proteína, determinada adicionando-se $800 \mu\text{L}$ do sobrenadante e $200 \mu\text{L}$ do reagente do kit Bio-Rad; após período de 15 minutos, realizou-se a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro UV (Shimadzu).

O teste de proteína Bio-Rad, realizado com base no método de BRADFORD (1976), é um procedimento simples e seguro para determinar a concentração de proteína solubilizada. Baseia-se na mudança de cor do

corante ácido “Comassie Brilliant Blue”, adicionado à solução de proteína, e subsequente leitura a 595 nm em espectrofotômetro.

Comparando-se o resultado das amostras com uma curva-padrão obteve-se a concentração de proteína existente. Relacionando a concentração de proteína (mg) com o volume inicial de amostra (mL) determinou-se a biomassa fúngica. Foram descontados do controle os resultados das amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.13 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO DE SOLO SRP17C

A identificação da linhagem SRP17c foi feita utilizando a técnica do microcultivo de RIDDEL (1950), que consiste em crescer o fungo em um meio de cultivo em que já esteja adaptado; nesse caso, foi utilizado meio BDA (Batata Dextrose Agar), sob lamínulas de vidro.

Após crescimento, essa lamínula foi retirada vagarosamente para que não houvesse destruição das organelas e estruturas de reprodução do fungo. A lamínula foi colocada cuidadosamente sobre uma gota de lactofenol azul de algodão e depositada em uma lâmina de microscópio; a seguir, foram observadas as estruturas do fungo ao microscópio de luz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EFEITO DE DOSES DO HERBICIDA DIURON E PYTHIOBAC-SODIUM NA BIOTA DO SOLO

O objetivo dos experimentos desenvolvidos em casa de vegetação do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica dos Agronegócios de Grãos e Fibras do Instituto Agrônômico (IAC) em Campinas, foi verificar a influência das diferentes doses dos herbicidas na população microbiana existente no solo e isolar os fungos de solos que não sofreram inibição de crescimento quando receberam a mais alta dosagem dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium.

4.1.1 EFEITO DAS DOSES DE DIURON APLICADOS NO SOLO ARENOSO E ARGILOSO

As figuras 4.1 e 4.2 mostram os experimentos na casa de vegetação, onde foi plantada a variedade de algodão IAC 23, utilizando solo argiloso e arenoso, respectivamente, com a aplicação de diferentes doses do herbicida diuron.

No solo arenoso (Figura 4.1), as plantas que receberam a maior dose de diuron (8x) morreram, o que não ocorreu no solo argiloso (Figura 4.2), onde as plantas não morreram com nenhuma das doses aplicadas. Esse fato pode ter ocorrido devido à biodisponibilidade do herbicida no solo arenoso ser maior do que no argiloso, visto que o solo argiloso possui cargas que retêm mais o herbicida no solo. O solo arenoso, possuindo menor quantidade de cargas, permite que o herbicida fique mais livre na solução do solo, facilitando a lixiviação e a absorção do herbicida pelas plantas, tornando as plantas não-alvo mais suscetíveis ao produto.

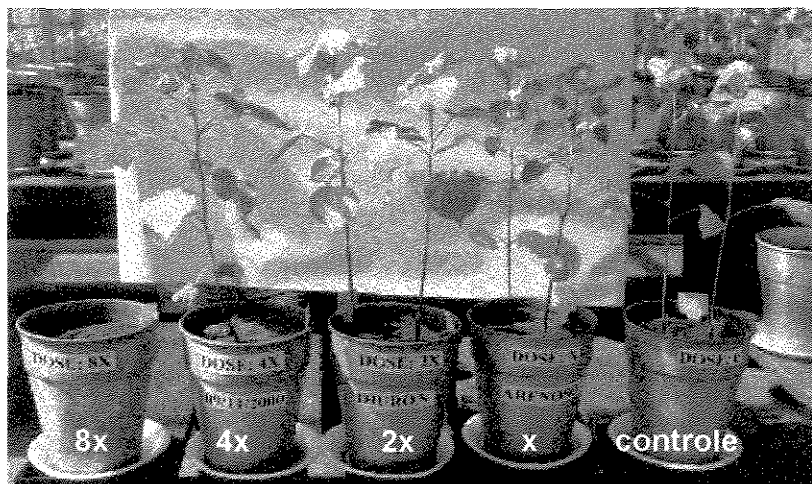


Figura 4.1: Crescimento de algodão (IAC 23), plantado em solo arenoso com diferentes doses de diuron.



Figura 4.2: Crescimento de algodão (IAC 23), plantado em solo argiloso com diferentes doses de diuron.

As figuras 4.3 e 4.4 representam a variação do pH para o solo argiloso (5,66 a 7,38), e para o arenoso (5,87 a 7,96) ao longo do tempo. Após aplicação do herbicida para quaisquer das doses de diuron utilizadas, tanto no solo argiloso como no arenoso, o pH tornou-se mais alcalino com o tempo.

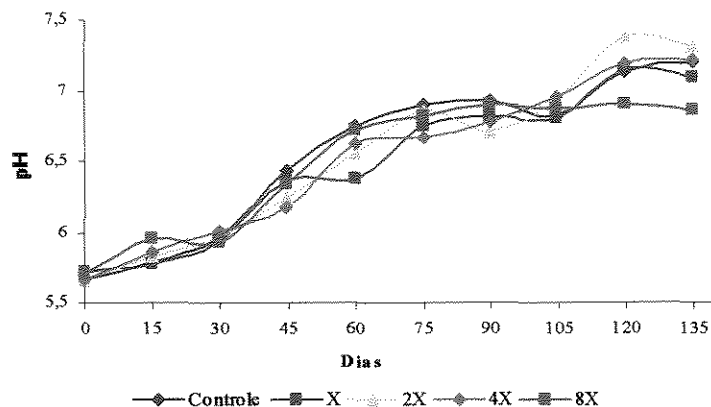


Figura 4.3: Variação do pH, em solo argiloso com aplicação de diuron, em função do tempo.

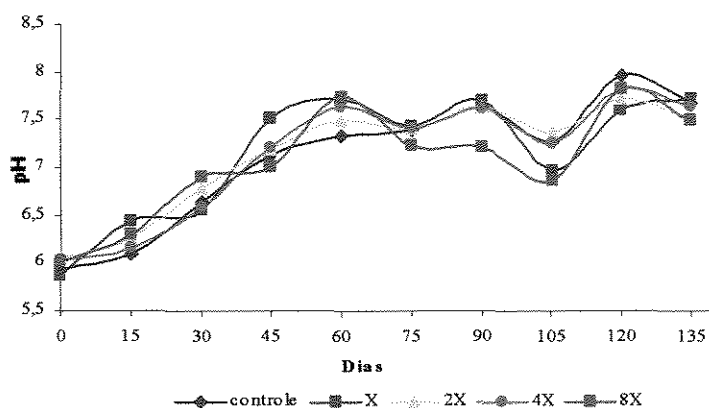


Figura 4.4: Variação do pH, em solo arenoso com aplicação de diuron em função do tempo.

A contagem de células bacterianas viáveis, em solos argiloso e arenoso após a aplicação de diuron, realizada durante 135 dias em intervalos de 15 dias, está representada nas figuras 4.5 e 4.6.

Mediante contagem de células bacterianas viáveis em solo argiloso, ocorreu queda da população de 10^7 - 10^6 ufc g^{-1} , para o controle e a dose X até 60 dias. Nas outras doses, 2x, 4x e 8x, a população diminuiu de 10^8 - 10^6 ufc g^{-1} . Aos 75 dias a população aumentou para 10^8 ufc g^{-1} de solo em todas as doses aplicadas; esse aumento pode ter ocorrido, provavelmente,

devido à maior quantidade de água colocada nos vasos. Após esse dia a população voltou a diminuir ficando no fim do experimento em 10^7 ufc g^{-1} .

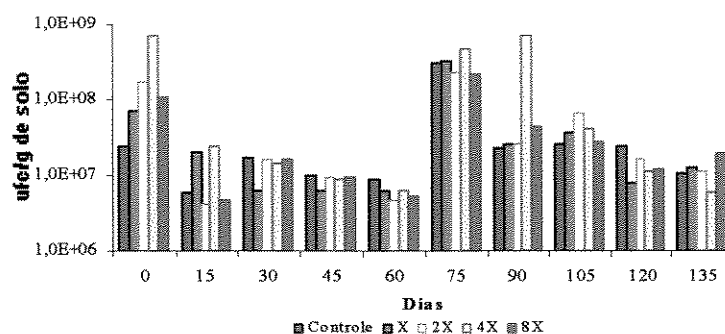


Figura 4.5: Variação no número de bactérias em solo argiloso contendo diuron.

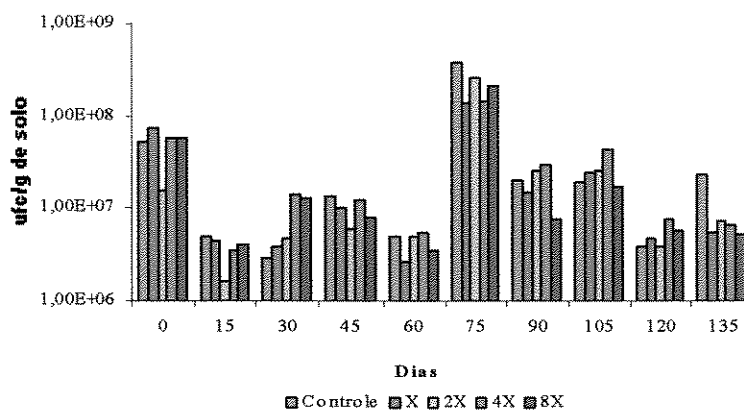


Figura 4.6: Variação no número de bactérias em solo arenoso contendo diuron.

Para o solo arenoso, observou-se queda na população de 10^7 - 10^6 ufc g^{-1} até 60 dias. Aos 75 dias, ocorreu aumento da população de bactérias para 10^8 ufc g^{-1} em todas as doses aplicadas. Esse aumento também pode ter ocorrido devido à maior quantidade de água colocada nos vasos. Após esse dia até o fim do experimento, houve redução da população em torno de 10^6 ufc g^{-1} em todas as doses de diuron que foram aplicadas, exceto a do controle que revelou redução de 10^7 ufc g^{-1} .

SUMPONO et al. (2003), estudando o efeito do diuron em bactérias aquáticas provenientes de águas residuais, em escala piloto, realizou contagem de bactéria total, bactéria cultivável e *Aeromonas* spp. Após a contaminação com diuron as bactérias totais, bactéria cultivável e *Aeromonas* spp aumentaram por duas semanas, voltando em seguida aos valores iniciais. Esse fato pode ter sido causado pelo aumento da concentração das fontes de carbono na planta-piloto.

A contagem das populações de fungos para os dois solos estão representadas nas figuras 4.7 e 4.8. Para o solo argiloso, o controle variou entre 10^4 e 10^3 ufc g⁻¹ até 60 dias; aos 75 dias, a população aumentou para 10^5 ufc g⁻¹ mostrando redução para 10^4 ufc g⁻¹ até o fim do experimento. Na dose x a variação foi entre 10^7 e 10^3 ufc g⁻¹ até 45 dias; aos 60 dias, aumentou para 10^4 ufc g⁻¹ e aos 75 dias para 10^5 ufc g⁻¹. Após esse período manteve-se em 10^4 ufc g⁻¹ até o fim. Na dose 2x o experimento iniciou-se com população de 10^5 ufc g⁻¹, a partir do 15.º dia a população variou de 10^3 a 10^4 ufc g⁻¹, e após os 75 dias, variou entre 10^5 e 10^4 ufc g⁻¹ até o fim do experimento. Na dose 4x a contagem iniciou em 10^6 ufc g⁻¹, a partir do 15.º dia, começou a variar na faixa de 10^3 a 10^4 ufc g⁻¹ até o fim do experimento. Na dose 8x a população de fungos variou entre 10^5 , 10^4 e 10^3 ufc g⁻¹ durante todo o experimento.

Para o solo arenoso, o controle iniciou com uma população de fungos de 10^7 ufc g⁻¹ e, a partir do 15.º dia, começou a variar entre 10^3 e 10^4 ufc g⁻¹ até o fim do experimento. Na dose x a contagem iniciou em 10^7 ufc g⁻¹, a partir do 15.º dia variou entre 10^3 e 10^4 ufc g⁻¹ até 60 dias; aos 75 dias, aumentou para 10^5 ufc g⁻¹, voltando aos 90 dias a variar entre 10^3 e 10^4 ufc g⁻¹ até o fim. Na dose 2x ocorreu variação entre 10^3 e 10^4 ufc g⁻¹ durante todo o experimento. Na dose 4x a população de fungos iniciou com contagem de 10^6 ufc g⁻¹ até o 15.º dia; a partir do 30.º dia começou a variar entre 10^3 a 10^4 ufc g⁻¹ até o fim do experimento. Na dose 8x a contagem iniciou-se com 10^6 ufc g⁻¹ caindo para 10^5 ufc g⁻¹ no 15.º dia e, a partir do 30.º dia, houve variação entre 10^3 e 10^4 ufc g⁻¹ até o fim.

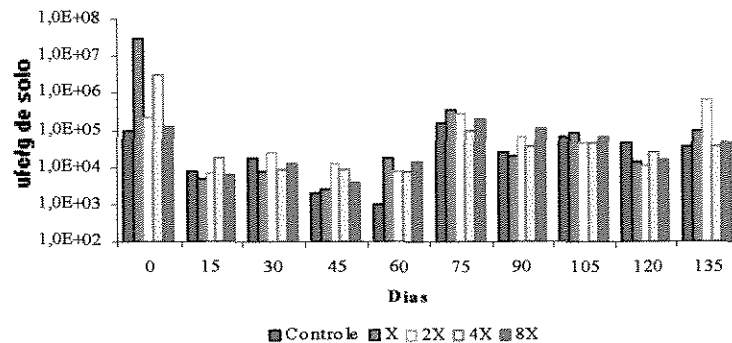


Figura 4.7: Variação da população de fungos em solo argiloso contendo diferentes doses de diuron.

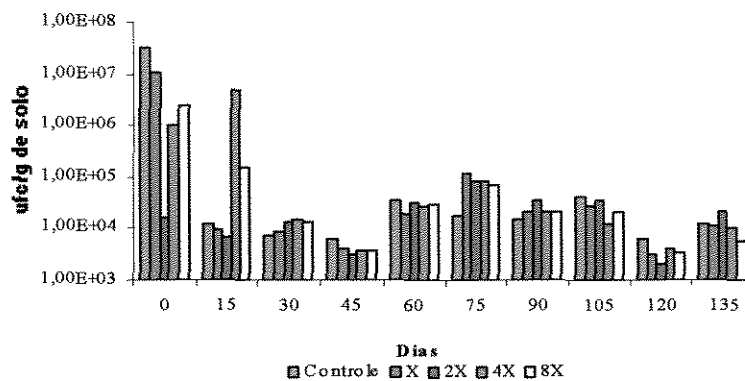


Figura 4.8: Variação da população de fungos em solo arenoso contendo diferentes doses de diuron.

A contagem de actinomicetos viáveis em solo argiloso e arenoso estão representados nas figuras 4.9 e 4.10. No solo argiloso, a população variou entre 10^6 ufc g^{-1} e 10^7 ufc g^{-1} em todas as doses de diuron aplicadas, exceto a contagem aos 75 dias quando ocorreu aumento de 10^8 ufc g^{-1} para todas as doses de aplicadas.

Para o solo arenoso, o controle iniciou com uma população de 10^8 ufc g^{-1} , a partir do 15.^o dia começou a variar entre 10^6 ufc g^{-1} e 10^5 ufc g^{-1}

até 60 dias. Aos 75 dias a população aumentou de 10^8 ufc g^{-1} voltando a variar entre 10^6 ufc g^{-1} e 10^7 ufc g^{-1} até o fim.

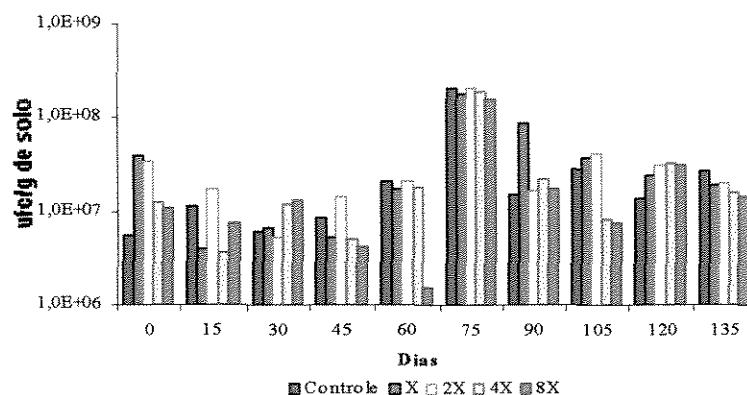


Figura 4.9: Variação no número de actinomicetos em solo argiloso contendo diuron.

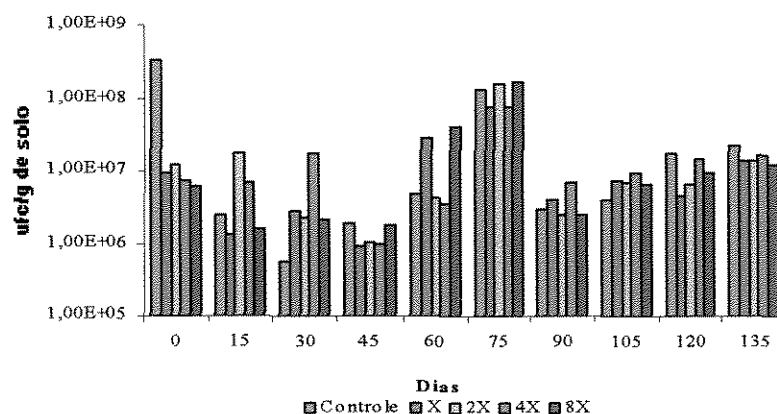


Figura 4.10: Variação no número de actinomicetos em solo arenoso contendo diuron.

Na dose x, a população manteve-se em 10^6 ufc g^{-1} do início até 30 dias. Aos 45 dias caiu para 10^5 ufc g^{-1} voltando aos 60 dias a variar entre 10^6 ufc g^{-1} a 10^7 ufc g^{-1} até o fim. Nas doses 2x e 8x, ocorreu variação entre 10^6 ufc g^{-1} a 10^7 ufc g^{-1} em todos os dias, com exceção da coleta aos 75 dias quando ocorreu um aumento de 10^8 ufc g^{-1} . Na dose 4x a população variou entre 10^6 ufc g^{-1} e 10^7 ufc g^{-1} , exceto aos 45 dias, quando a população esteve na ordem de 10^5 ufc g^{-1} . O aumento da população de actinomicetos

aos 75 dias em ambos os solos, semelhante ao ocorrido com a população de bactérias, também pode ter sido consequência de maior quantidade de água colocada nos vasos.

4.1.2 EFEITO DAS DOSES DE PYRITHIOPAC-SODIUM APLICADOS NO SOLO ARENOSO E ARGILOSO.

As figuras 4.11 e 4.12 mostram o experimento na casa de vegetação, onde foi aplicado o herbicida pyrrithiobac-sodium com diferentes dosagens, em solo argiloso e arenoso e utilizando a variedade de algodão IAC-23. Diferentemente do que ocorreu quando a dose mais elevada de diuron foi aplicada no solo arenoso, ou seja, a morte de todas as plantas, para o pyrrithiobac-sodium as plantas não morreram, o que pode estar relacionado ao fato de pyrrithiobac-sodium ser um herbicida mais seletivo para o algodão.

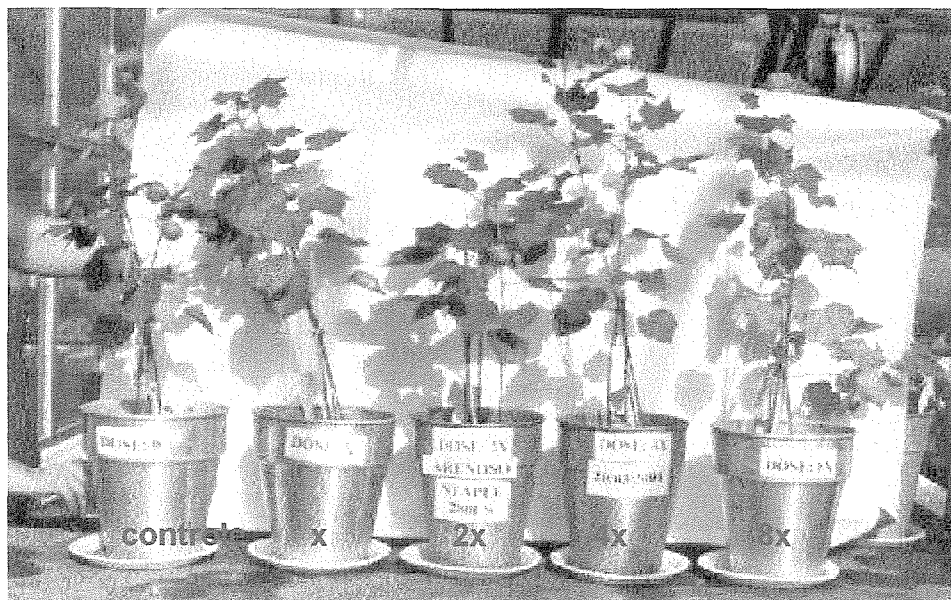


Figura 4.11: Crescimento de algodão (IAC 23) plantado em solo arenoso com diferentes dosagens de pyrrithiobac-sodium.

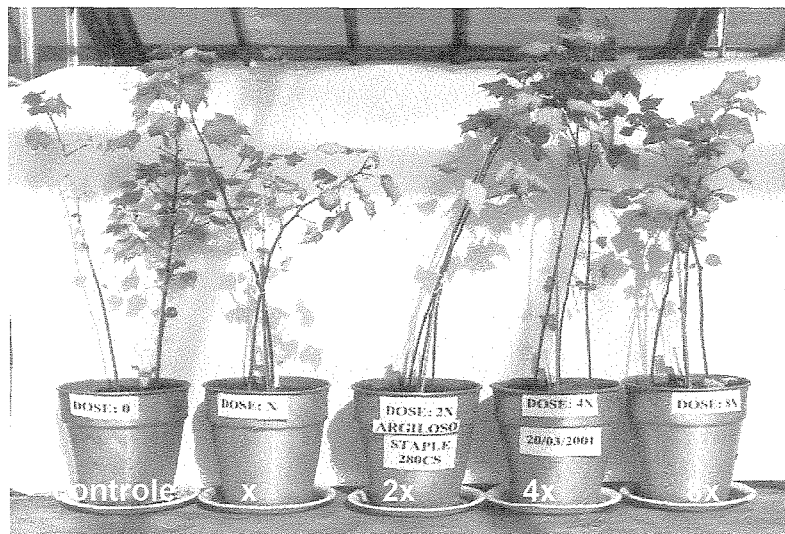


Figura 4.12: Crescimento de algodão (IAC 23) plantado em solo argiloso com diferentes dosagens de pyriithiobac-sodium.

As figuras 4.13 e 4.14 representam os resultados das determinações de pH para o solo argiloso (5,66 a 7,20), e para o solo arenoso (6,74 a 7,82). Em ambos os solos, o pH tornou-se mais alcalino com o passar do tempo nas diferentes concentrações de pyriithiobac-sodium.

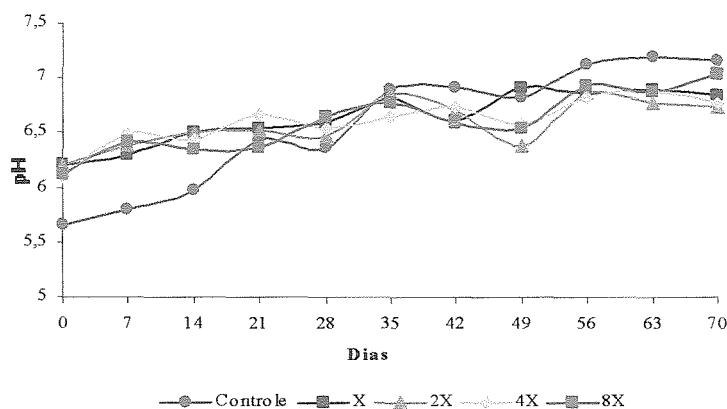


Figura 4.13: Variação do pH, em solo argiloso, com aplicação de pyriithiobac-sodium, em vista das diferentes épocas de amostragens.

As medidas de pH tem o objetivo técnico de acompanhar a evolução da fertilidade do solo (RAIJ et al., 1996).

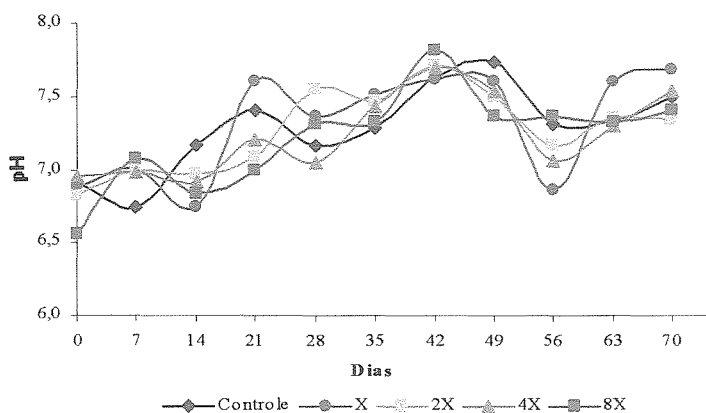


Figura 4.14: Variação do pH, em solo arenoso, com aplicação de pyrithiobac-sodium, em vista das diferentes épocas de amostragens.

A contagem de células bacterianas viáveis em solos argiloso e arenoso, após a aplicação de pyrithiobac-sodium realizada durante 70 dias em intervalos de 7 dias, está representada nas figuras 4.15 e 4.16.

A quantidade de células bacterianas viáveis em solo argiloso variou entre 10^6 e 10^7 ufc g^{-1} durante todo o experimento, exceto as doses x no 1.^o dia de experimento, 4x no 7.^o dia e 8x no 1.^o e 7.^o dias que ficaram na ordem de 10^8 ufc g^{-1} .

Para o solo arenoso, a variação da contagem bacteriana ocorreu entre 10^6 e 10^7 ufc g^{-1} de solo, para todas as doses utilizadas.

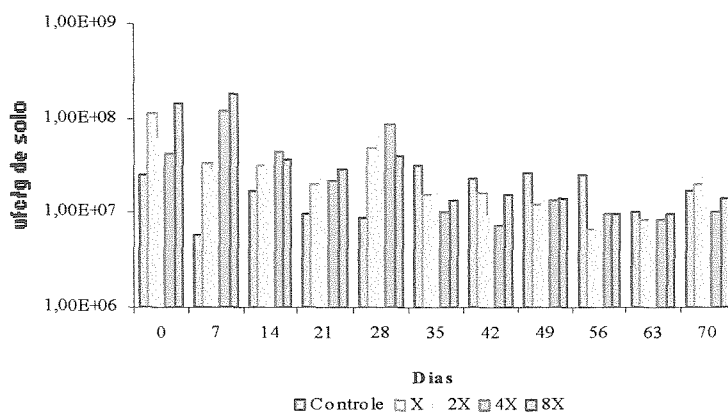


Figura 4.15: Variação no número de bactérias em solo argiloso contendo pyriithiobac-sodium.

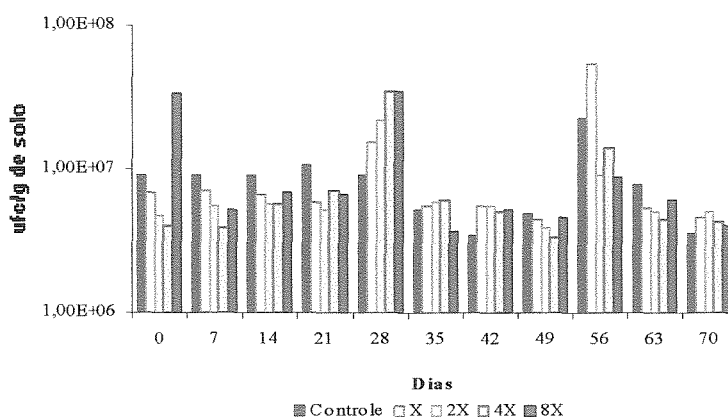


Figura 4.16: Variação no número de bactérias em solo arenoso contendo pyriithiobac-sodium.

A contagem da população de fungos para os dois solos estão representadas nas figuras 4.17 e 4.18. Para o solo argiloso (Figura 4.17), ocorreu variação de 10^3 a 10^4 ufc g^{-1} de solo, no controle, nas doses 2x e 4x, exceto o controle aos 35 dias, quando a população aumentou para 10^5 ufc g^{-1} . Nas doses x e 8x, a população manteve-se na ordem de 10^4 ufc g^{-1} de solo. A dose 2x, no 56.^o dia, aumentou a população na ordem de 10^6 ufc g^{-1} de solo.

Para o solo arenoso (Figura 4.18), a população de fungos variou na ordem de 10^4 a 10^5 ufc g^{-1} de solo em todas as diferentes doses de pyrithiobac-sodium aplicadas.

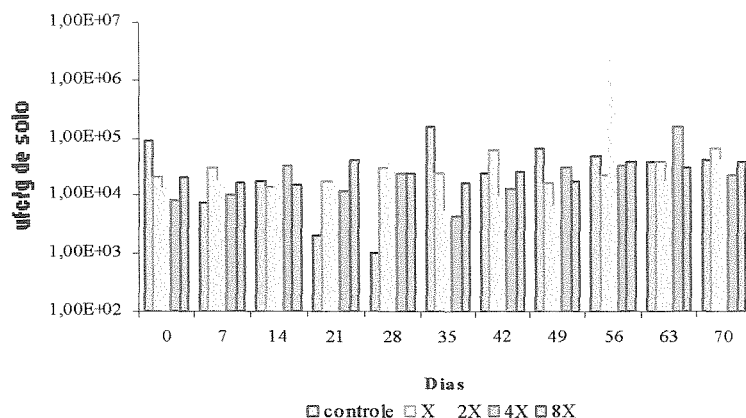


Figura 4.17: Variação no número de fungos em solo argiloso contendo pyrithiobac-sodium.

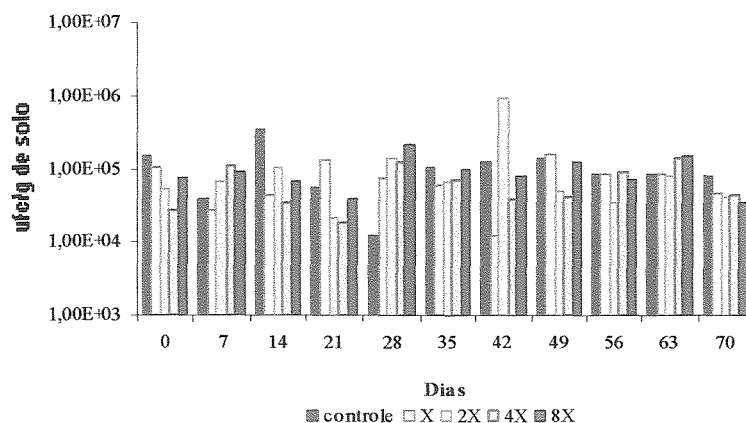


Figura 4.18: Variação no número de fungos em solo arenoso contendo pyrithiobac-sodium.

O levantamento das populações de actinomicetos, em solo argiloso e arenoso, após a aplicação de pyrithiobac-sodium, é mostrado nas figuras 4.19 e 4.20 respectivamente.

A contagem das populações de actinimicetos para os dois solos variou na ordem de 10^6 a 10^7 ufc g^{-1} de solo, exceto a dose 2x do solo argiloso (Figura 4.19) a população permaneceu na ordem de 10^7 ufc g^{-1} de solo durante todo o experimento. A dose x do solo argiloso, no 7^o dia,

revelou aumento da população 10^8 ufc g^{-1} de solo; a testemunha mostrou o mesmo aumento aos 35 dias de experimento.

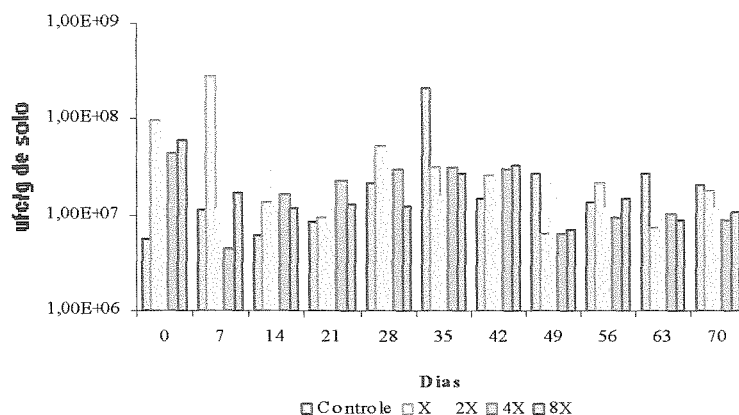


Figura 4.19: Variação no número de actinomicetos em solo argiloso contendo pyriithiobac-sodium.

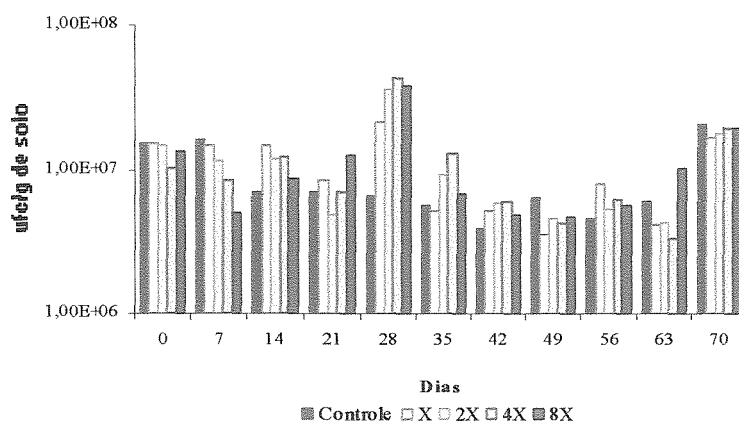


Figura 4.20: Variação no número de actinomicetos em solo arenoso contendo pyriithiobac-sodium.

4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SOLO COM POTENCIAL PARA A DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM

A estratégia de isolamento seletivo empregada no presente estudo permitiu a obtenção de 55 isolados de fungos quando se utilizou o herbicida diuron e 51 isolados com o herbicida pyrithiobac-sodium.

Esses fungos foram isolados do experimento em casa de vegetação a partir de amostras de solo previamente tratadas com os herbicidas diuron e pyrithiobac-sodium.

Os fungos isolados foram cultivados em placas de Petri com meio BDA-Difco, contendo 100x a dose de campo, 3325 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 217,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos respectivos herbicidas.

As figuras 4.21 e 4.22 mostram um exemplo do crescimento dos fungos isolados de solo, quando foi utilizado diuron e pyrithiobac-sodium, respectivamente.

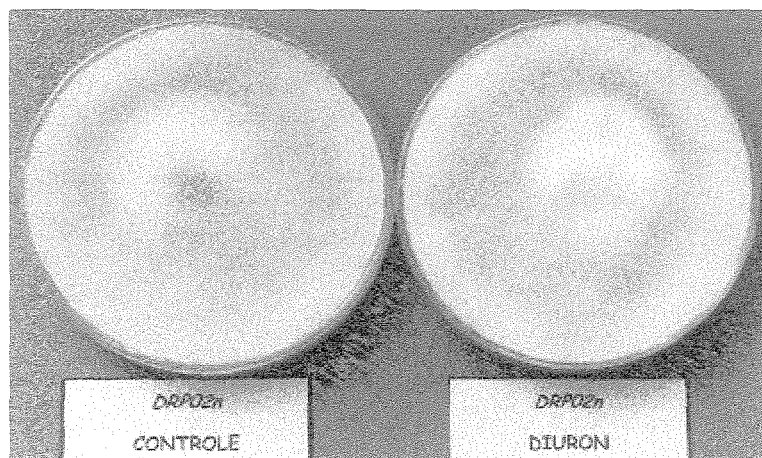


Figura 4.21: Crescimento do isolado de solo DRP02n quando foi utilizado 3.325 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de diuron.

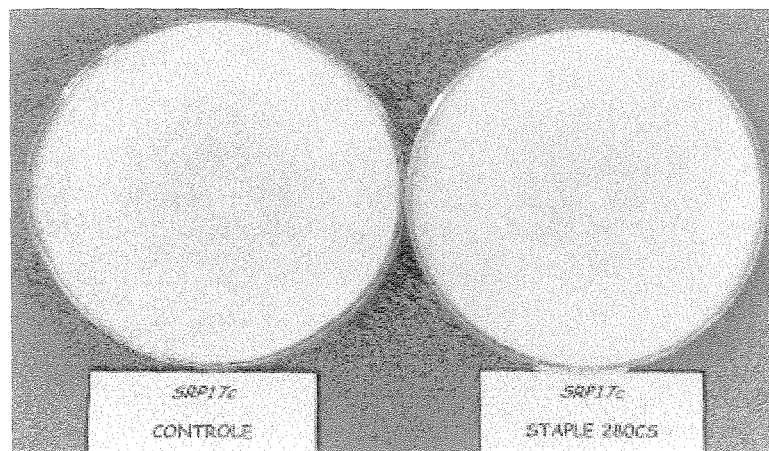


Figura 4.22: Crescimento do isolado de solo SRP17c quando foi utilizado $217,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de pyriithiobac-sodium.

As tabelas 4.1 e 4.2 descrevem os resultados do crescimento dos isolados de solo em meio BDA-Difco com a adição dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium.

Após a análise desses resultados, dos 55 isolados de solo testados com diuron e dos 51 com pyriithiobac-sodium, um apresentou crescimento ótimo e três mostraram crescimento muito bom com diuron; sete apresentaram crescimento ótimo com pyriithiobac-sodium.

Os fungos testados com diuron que apresentaram crescimento ótimo e muito bom foram: DP24e DRP02n, DP24o e DRP02e, e os testados com pyriithiobac-sodium foram: SP21b, SP20b, SRP20e, SP16a, SRP17g, SRP17c, SP17c. Esses fungos foram selecionados para a continuação dos experimentos.

Os quatros fungos selecionados do meio contendo diuron foram submetidos a teste de resistência utilizando pyriithiobac-sodium; os sete selecionados do meio contendo pyriithiobac-sodium foram também submetidos a teste de resistência usando diuron. O teste realizado foi semelhante ao anterior, sendo utilizadas as doses de $3.325 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o diuron e $217,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o pyriithiobac-sodium. Com esse teste selecionaram-se os isolados mais resistentes aos dois herbicidas (Tabela

4.3), para serem utilizados posteriormente em novos experimentos. Os resultados revelaram que dos sete fungos crescidos no meio contendo diuron, quatro apresentaram crescimento ótimo, bem como os quatro crescidos em pyriothobac-sodium.

Com esse resultado, foram selecionados oito fungos isolados de solo para a continuação dos experimentos. Os fungos selecionados foram: SRP20e, SP16a, SRP17g, SRP17c, DRP02n, DP24o, DRP02e e DP24e.

Tabela 4.1: Fungos isolados de solos tratados com diuron

Fungos	Diuron	Fungos	Diuron
	3.325 $\mu\text{g mL}^{-1}$		3325 $\mu\text{g mL}^{-1}$
DP22j	+ / -	DRP01b	+ / -
DRP03i	+ / -	DP25a	+
DP23l	+ / -	DRP21c	+
DRP02s	+ / -	DP22i	+ / -
DRP03j	+ / -	DP24c	+
DP22l	+ / -	DP23c	++
DP23n	++	DP25l	+
DP23i	++	DP25i	+ / -
DP23g	+ / -	DRP02h	++
DP25g	+	DP25h	+++
DP02h	++	DP23k	+ / -
DRP02r	+ / -	DP21a	+ / -
DRP02n	++++	DRP0f	+
DRP02j	+ / -	DRP02d	+
DP23h	+	DRP02b	+
DP22a	+ / -	DP23a	+
DP24o	++++	DRP02p	+ / -
DRP02e	++++	DP23f	+ / -
DRP02o	+++	DP25c	+
DRP02i	+	DRP04b	+
DRP02g	+	DP24b	+ / -
DRP21d	++	DP25d	+++
DRP02m	+	DRP03e	+
DP25b	++	DP25f	+ / -
DP24e	+++++	DRP04a	+
DP21d	+	DRP21g	+ / -
DRP02f	+ / -	DRP02a	+ / -
DP22k	+ / -		

Crescimento relativo: ótimo (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-); sem crescimento (-).

Tabela 4.2: Fungos isolados de solos tratados com pyriithiobac-sodium

Fungos	Pyrithiobac-sodium	Fungos	Pyrithiobac-sodium
	217,2 µg mL ⁻¹		217,2 µg mL ⁻¹
SP21a	+	SRP17c	+++++
SP21d	+	SRP19d	++
SP20g	+ / -	SP16c	+
SP20h	+ / -	SRP16f	++++
SP20c	+ / -	SP17c	+++++
SP17f	+ / -	SRP17d	+
SP20a	+ / -	SRP17f	+ / -
SP19b	-	SRP18a	+
SP21b	+++++	SRP18b	+ / -
SP21c	+	SRP18d	+ / -
SRP19c	++++	SRP19e	++
SRP18d	+ / -	SRP19b	+
SRP19b	+	SRP17a	+ / -
SRP19d	++	SRP16g	-
SRP17e	++	SP17e	+ / -
SRP16b	++++	SRP17e	+
SRP20b	+	SRP16h	++++
SRP17a	++	SRP16e	+
SRP16a	++	SP17g	+ / -
SP20b	+++++	SRP17d	+ / -
SRP20e	+++++	SP20d	+ / -
SP16a	+++++	SRP17b	+ / -
SRP17g	+++++	SP17d	+ / -
SP19a	+++	SP21b	+ / -
SP17b	++	SRP16c	+ / -
SRP18e	++		

Crescimento relativo: ótimo (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-); sem crescimento (-).

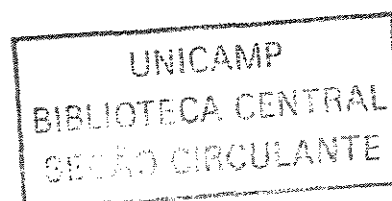


Tabela 4.3: Seleção dos isolados de solo mais resistentes aos herbicidas diuron e pyrrithiobac-sodium

Fungos	Diuron
	3.325 µg mL ⁻¹
SP21b	++
SP20b	+++
SRP20e	+++++
SP16a	+++++
SRP17g	+++++
SRP17c	+++++
SP17c	++
Fungos	Pyrrithiobac-sodium
	217,2µg mL ⁻¹
DRP02n	+++++
DP24o	+++++
DRP02e	+++++
DP24e	+++++

Crescimento relativo: ótimo (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-); sem crescimento (-).

4.3 SELEÇÃO DAS LINHAGENS DOS BASIDIOMICETOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM

As 24 linhagens de basidiomicetos utilizadas foram submetidas ao experimento de resistência microbiológica a concentrações crescentes dos herbicidas diuron e pyrrithiobac-sodium, visando à seleção das linhagens mais resistentes, para aplicação em experimentos de biodegradação. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4: Crescimento das linhagens de basidiomicetos submetidas a três diferentes concentrações de diuron

Linhagens	Concentração de Diuron		
	33,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$	332,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3.325 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pleurotus</i> 98/33	++	+/-	-
<i>Pleurotus</i> 98/36	++	-	-
<i>Pleurotus</i> 97/37	+/-	-	-
<i>Pleurotus</i> 94/03	+/-	+/-	-
<i>Pleurotus</i> 001	+	+/-	-
<i>Pleurotus</i> 016	+++	++	++
<i>Pleurotus</i> sp P1	+	-	-
<i>Pleurotus</i> Tailândia	+	-	-
<i>Pleurotus</i> florida	+	-	-
<i>Pleurotus</i> saior-caju	+	+/-	-
<i>Pleurotus</i> 020	+/-	-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 068)	+++	+++	+++
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 394)	+/-	+/-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 396)	+/-	-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 507)	+++	++	+++
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 016)	+/-	-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 517)	-	-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 440)	-	-	-
H2	+	+/-	+/-
<i>P. chrysosporium</i>	++++	++++	++++
<i>Ag. campestris</i>	++++	++	++++
<i>Shiitake</i> MOA	+/-	+/-	-
<i>Shiitake</i> MP310	+	+/-	-
<i>Shimeji</i>	++	-	-

Crescimento relativo: ótimo (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-); sem crescimento (-).

Tabela 4.5: Crescimento das linhagens de basidiomicetos submetidas a três diferentes concentrações de pyrithiobac-sodium

Linhagens	Concentração de Pyrithiobac-sodium		
	2,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$	21,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$	217,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Pleurotus</i> 98/33	+	+	+
<i>Pleurotus</i> 98/36	++	+	++
<i>Pleurotus</i> 97/37	++	+	++
<i>Pleurotus</i> 94/03	+	+	-
<i>Pleurotus</i> 001	++	+	++
<i>Pleurotus</i> 016	+++	++	++
<i>Pleurotus</i> sp P1	+++	-	++
<i>Pleurotus</i> tailandia	++	+	++
<i>Pleurotus</i> florida	++	+	++
<i>Pleurotus</i> sajor-caju	++	+	-
<i>Pleurotus</i> 020	++	+	++
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 068)	+++	+++	+++
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 394)	+	+	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 396)	+/-	-	+
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 507)	+++	+/-	++
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 016)	++	+/-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 517)	-	-	-
<i>Pleurotus</i> sp (CCB 440)	-	-	-
H2	+	-	-
<i>P. chrysosporium</i>	+++++	+++++	+++++
<i>Ag. campestris</i>	+++++	+++++	+++++
<i>Shiitake</i> MOA	+	+	+
<i>Shiitake</i> MP310	+	+/-	+
<i>Shimeji</i>	++	+	++

Crescimento relativo: abundante (+++++); muito bom (++++); bom (+++); regular (++); pobre (+); muito pobre (+/-); sem crescimento (-).

Os resultados apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5 atestam que as linhagens *Pleurotus* sp (016), *Pleurotus* sp (CCB 068), *Pleurotus* sp (CCB 507), *Phanerochaete chrysosporium* e *Agaricus campestris* foram as que apresentaram os melhores crescimentos nas três doses de diuron e pyriithiobac-sodium utilizadas. Portanto, essas linhagens que apresentaram crescimento micelial entre regular e ótimo, foram selecionadas. Algumas fotos de inibição e crescimento referentes a esse experimento podem ser vistas nas figuras 4.23 e 4.24.

Na figura 4.23 pode-se verificar que a linhagem *Pleurotus* sp florida (001) foi inibida, não conseguindo crescer na presença de diuron, ou seja, na placa. Já a linhagem *Pleurotus* sp (CCB068) conseguiu crescer sem dificuldade sobre toda a placa que continha diuron, demonstrando grande poder de resistência perante esse herbicida.

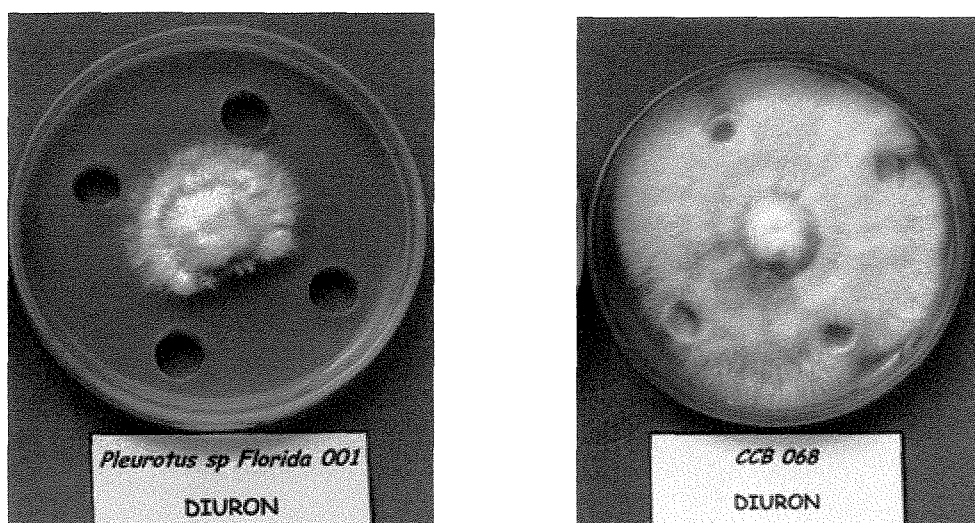


Figura 4.23: Crescimento das linhagens *Pleurotus* sp florida 001 (sensível) e *Pleurotus* sp (CCB068) (resistente) quando foi utilizado o herbicida diuron na concentração de $332,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A linhagem *Pleurotus* sp (P1), apresentada na figura 4.24, mostrou inibição de crescimento e por esse motivo foi descartada. Na mesma figura, nota-se que *Pleurotus* sp (CCB068) apresentou sucesso nos ensaios preliminares de degradação de compostos tóxicos, nesse caso, o pyrithiobac-sodium, e por esse motivo mereceu destaque e observação mais detalhada.

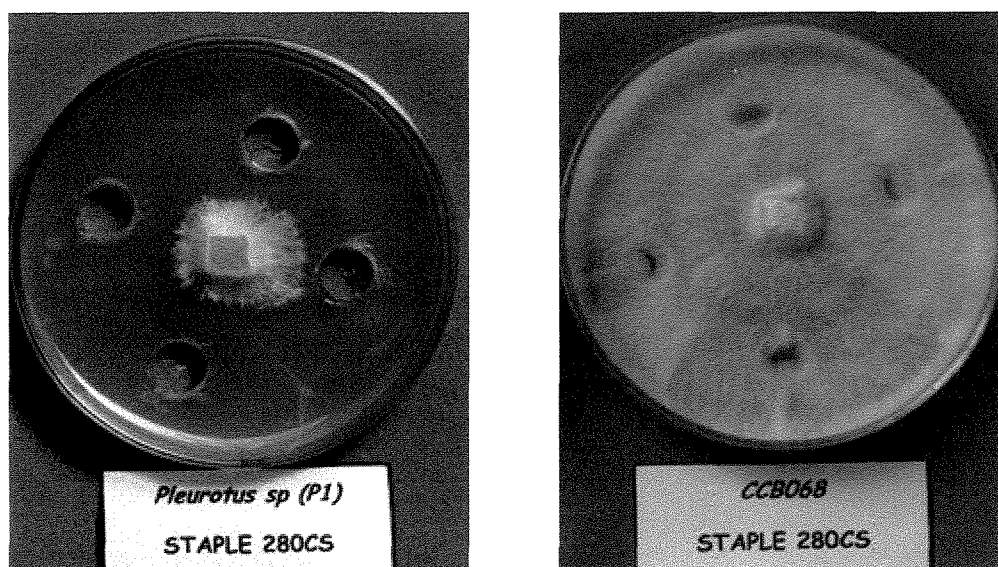


Figura 4.24: Crescimento das linhagens *Pleurotus* sp (P1) (sensível) e *Pleurotus* sp CCB068 (resistente) quando foi utilizado o herbicida pyrithiobac-sodium na concentração de $21,72 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os ensaios de resistência aos herbicidas possibilitaram a seleção de cinco linhagens capazes de crescer na presença de altas concentrações de diuron e pyrithiobac-sodium *in vitro*. A utilização de microrganismos em ensaios de degradação de compostos poluentes *in vitro* ou *in situ*, requer que os mesmos apresentem tolerância a concentrações elevadas dos compostos a serem degradados (SETTE, 2001).

O crescimento dos basidiomicetos na presença de altas concentrações de diuron e pyrithiobac-sodium pode estar relacionado à

capacidade dessas linhagens em utilizar as moléculas de herbicidas como fonte de carbono e/ou nitrogênio para crescimento.

Estudos adicionais de degradação e atividade enzimática foram realizados com essas linhagens capazes de se desenvolverem na presença dos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium, para verificar a capacidade de sua degradação.

Da seleção feita com as linhagens de Basidiomicetos e os fungos isolados do bioensaio, foram selecionados 13 para serem utilizados no experimento de biodegradação dos respectivos herbicidas. Os microrganismos que se mostraram mais resistentes aos dois compostos em estudo foram: *Pleurotus* sp (BCCB 507), *Pleurotus* sp (CCB 068), *Pleurotus* 016, *Ag. campestris*, *P. chrysosporium*, DP24e, DP24o, DP24o, DRP02n, SP16a, SRP17g, SRP17c e SRP20e.

4.4 DIURON COMO FONTE DE CARBONO

Os 13 fungos foram incubados em Meio Líquido Base (Tabela 3.4) (pg.39), e adicionou-se diuron na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após três dias de crescimento do inóculo.

O pH do meio foi determinado no 3.^o, 7.^o, 10.^o e 14.^o dias da adição do diuron (Tabela 4.6). Todos os meios apresentaram diminuição no pH, tornando-se bastante ácidos à medida que aumentavam os dias de incubação. A única exceção foi o *P. chrysosporium*, que manteve o pH com pouca variação (5,70-5,16). Essa diminuição nos valores do pH pode ser devido ao metabolismo dos fungos, como resultado da degradação do diuron.

Os meios de cultivos ácidos podem proporcionar a ativação das enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, Lacase, Peroxidase), visto que essas enzimas apresentam boa atuação em meios ácidos (TIEN e KIRK, 1984; KUWAHARA et al., 1984; KIRK e FARRELL, 1987; SCKLARZ et al., 1989).

Tabela 4.6: Valores de pH dos fungos que cresceram utilizando diuron como fonte de carbono

Fungos	pH			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
Controle	5,18	5,02	5,00	5,03
<i>P.sp</i> (BCCB507)	3,28	2,39	2,80	2,37
<i>Ag.campestris</i>	4,22	4,43	3,50	2,94
<i>P.chrysosporium</i>	5,68	5,70	5,57	5,16
<i>P. sp</i> (CCB068)	3,63	3,76	3,43	3,26
<i>Pleurotus</i> 016	2,78	2,31	2,43	2,35
DP24e	4,93	3,76	3,10	2,90
DP24o	3,84	2,55	2,41	2,47
DRP02n	5,54	4,16	4,49	2,72
DRP02e	4,00	2,33	2,63	2,38
SP16a	4,43	2,77	2,63	2,58
SRP17g	3,36	2,53	3,00	3,05
SRP17c	5,89	4,89	3,93	2,65
SRP20e	5,13	3,44	2,57	2,72

4.5 DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

A tabela 4.7 descreve os resultados da determinação das atividades enzimáticas de Manganês peroxidase (MnP) e Lignina peroxidase (LiP), produzidas pelos fungos após 3, 7, 10 e 14 dias da adição do herbicida diuron como fonte de carbono.

Pode-se verificar que todas as linhagens de basidiomicetos e fungos isolados de solo apresentaram atividade de MnP no 3.^o, 7.^o e 10.^o dias, destacando-se a linhagem *Pleurotus sp* (CCB 068), ocorrendo no 10.^o dia alta produção dessa enzima (63,94 U L⁻¹ min⁻¹). No 14.^o dia praticamente não se detectou atividade de MnP para a maioria dos fungos, sendo os únicos que apresentaram alguma atividade: *Ag. campestris* (1,79U L⁻¹min⁻¹), *P. chrysosporium* (2,42 U L⁻¹ min⁻¹), SP16a (0,58 U L⁻¹ min⁻¹), SRP17g (3,59 U L⁻¹ min⁻¹) e SRP20e (1,93 U L⁻¹ min⁻¹).

Tabela 4.7: Atividade de MnP e LiP dos fungos crescidos em diuron como fonte de carbono

Fungos	MnP (U/L.min)				LiP (U/L.min)			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
<i>P. sp</i> (BCCB507)	3.41	3.59	19.46	ND	0.19	0.03	0.12	ND
<i>A. campestris</i>	2.47	7.85	1.08	1.79	0.16	0.12	0.05	ND
<i>P. chrysosporium</i>	6.86	4.75	13.36	2.42	0.05	0.13	ND	ND
<i>P. sp</i> (CCB068)	8.16	6.19	63.94	ND	0.11	0.68	ND	ND
<i>Pleurotus</i> 016	5.96	4.08	2.87	ND	0.16	ND	0.39	ND
DP24e	9.33	7.31	6.50	ND	ND	0.18	0.22	ND
DP24o	4.30	5.25	5.92	ND	ND	0.12	0.13	ND
DRP02n	19.01	4.04	17.49	ND	0.17	0.03	ND	ND
DRP02e	12.33	3.18	9.82	ND	ND	ND	0.21	ND
SP16a	10.58	1.08	6.37	0.58	0.02	ND	0.17	ND
SRP17g	14.89	1.52	3.77	3.59	ND	ND	ND	ND
SRP17c	11.61	4.89	8.21	ND	ND	ND	0.16	ND
SRP20e	12.02	7.85	1.75	1.93	0.11	0.05	0.22	ND

ND: não detectado.

Na Tabela 4.7, na qual estão descritas as atividades de LiP, foi verificada produção dessa enzima para a maioria dos fungos aos 3, 7, 10 dias, com exceção do isolado de solo SRP17g, que não a produziu em nenhum dia. No 14.^o dia, não foi detectada atividade dessa enzima em nenhum sobrenadante das linhagens. A maior atividade de LiP foi obtida no 7.^o dia de cultivo para a linhagem *Pleurotus sp* CCB 068 (0,68 U L⁻¹ min⁻¹).

A lacase, de modo geral, não foi produzida, sendo detectados níveis muito baixos. Essa enzima somente foi produzida pelos isolados de solo DP24e (0,10 U L⁻¹ min⁻¹), DRP02n (0,07 U L⁻¹ min⁻¹), DRP02e (0,05 U L⁻¹ min⁻¹), SRP17g (0,02 U L⁻¹ min⁻¹) e pela linhagem *Pleurotus sp* (CCB 068) em todos os dias de cultivo, alcançando no 10.^o dia o máximo de 4,79 U L⁻¹ min⁻¹.

A produção de Peroxidase, apresentada na tabela 4.8, indica a atividade para todos os fungos, principalmente no 3.^o e 7.^o dias. A linhagem *Pleurotus sp* (CCB 068) produziu essa enzima em todos os dias de cultivo, destacando-se o 3.^o dia, quando se obteve 3,38 U L⁻¹ min⁻¹ de atividade.

Tabela 4.8: Atividade de Peroxidase dos fungos crescidos em diuron como fonte de carbono

Fungos	Peroxidase (U/L.min)			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
<i>P. sp</i> (BCCB507)	ND	0.05	ND	ND
<i>A. campestris</i>	0.49	ND	0.02	0.17
<i>P. chrysosporium</i>	0.30	ND	ND	ND
<i>P. sp</i> (CCB068)	3.38	1.96	3.35	2.35
<i>Pleurotus</i> 016	0.04	0.08	ND	ND
DP24e	0.23	0.16	ND	ND
DP24o	0.02	0.03	ND	ND
DRP02n	0.10	0.20	ND	ND
DRP02e	0.18	0.20	ND	0.14
SP16a	0.10	0.07	ND	ND
SRP17g	0.09	0.09	ND	ND
SRP17c	0.01	0.07	0.01	ND
SRP20e	ND	0.03	ND	ND

ND: não detectado.

❖ Degradação do Diuron

As amostras de cada linhagem de basidiomicetos e dos fungos isolados de solo obtiveram a porcentagem de degradação avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), descritas na tabela 4.9, quando se utilizou diuron como fonte de carbono.

Os dados obtidos por CLAE revelam seis fungos: *Pleurotus sp* (BCCB 507), *Pleurotus sp* (CCB068), *Pleurotus* 016, SRP17g, SRP17c e SRP20e, que foram capazes de degradar o diuron, acima de 50%. A mais alta taxa de degradação foi registrada para o *Pleurotus sp* (CCB068) (85,63%).

Tabela 4.9: Porcentagem de degradação do diuron produzida pelas linhagens crescidas com uma concentração inicial de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Fungos	Degradação			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
	%			
BCCB507	35,17	64,30	51,30	57,52
<i>Ag.campestris</i>	ND	ND	12,47	ND
<i>P.chrysosporium</i>	ND	ND	1,03	4,12
CCB068	ND	62,69	85,63	71,24
<i>Pleurotus 016</i>	53,93	62,06	44,40	33,14
DP24e	12,70	35,78	30,53	24,37
DP24o	ND	24,38	39,85	22,97
DRP02n	ND	ND	0,33	5,62
DRP02e	ND	46,64	36,04	32,57
SP16a	ND	16,69	22,30	0,96
SRP17g	ND	59,23	69,42	43,01
SRP17c	ND	27,38	34,82	71,08
SRP20e	ND	30,29	65,95	66,38

A figura 4.25 representa os gráficos referentes às atividades enzimáticas, ao tempo de cultivo e à porcentagem de degradação das linhagens *Pleurotus* sp (BCCB507), *Pleurotus* sp (CCB068) e SRP17c, selecionadas como mais promissoras, por apresentarem melhores resultados de degradação e enzimáticos nos dias analisados.

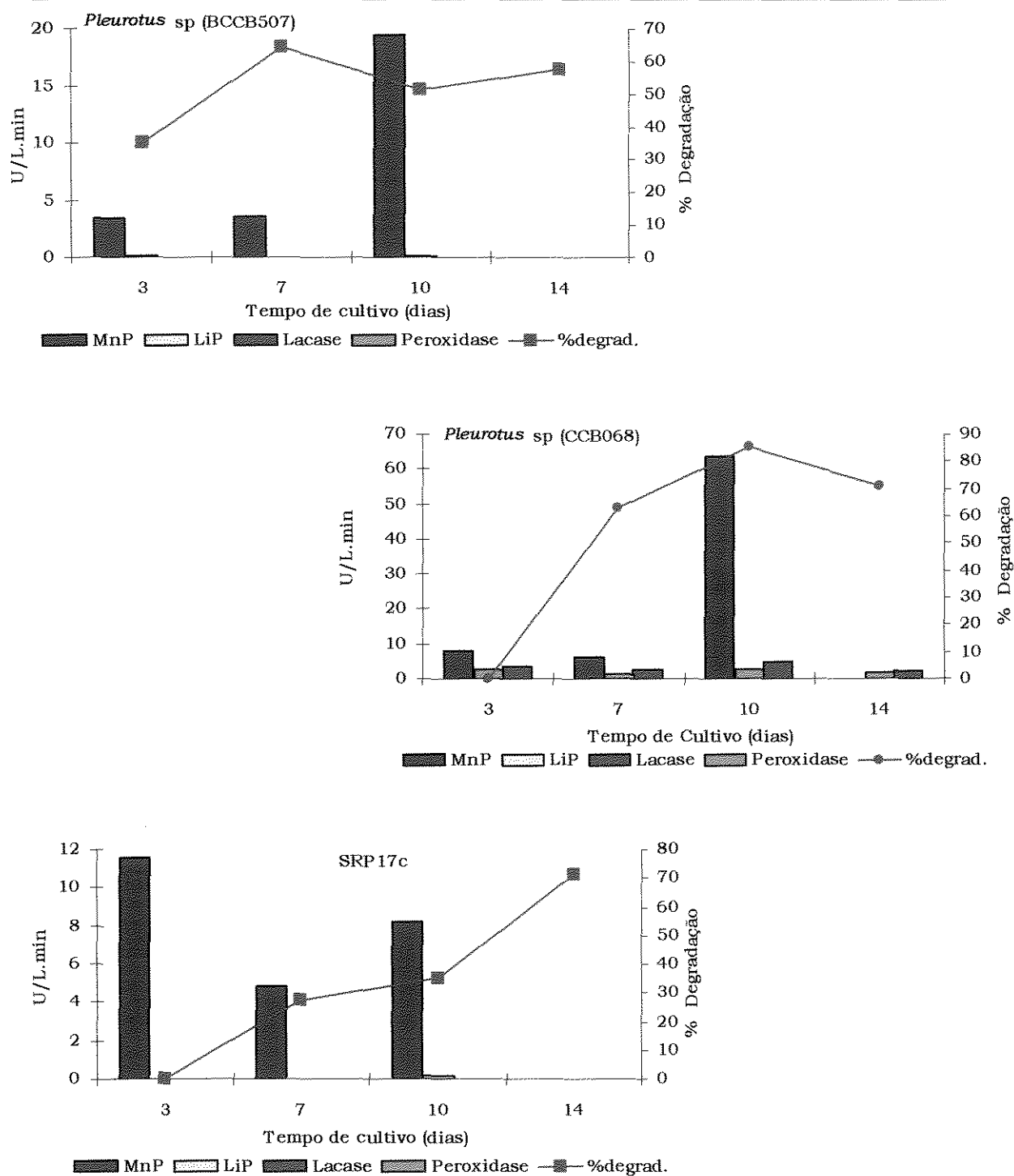


Figura 4.25: Atividades enzimáticas produzidas pelas linhagens *Pleurotus* sp (BCCB507), *Pleurotus* sp (CCB068), SRP17c e porcentagem de degradação quando se utilizou diuron como fonte de carbono na concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As figuras 4.26 e 4.27 representam os cromatogramas do controle e da linhagem SRP17c, em que se pode observar aumento do pico entre 10 e 11 minutos, com a diminuição do pico do diuron, representado entre 11,62 e 11,72 minutos.

O aparecimento desse pico pode ser indicativo da formação de metabólito desse composto. Verificou-se também, em todos os cromatogramas, a formação de dois picos entre dois e quatro minutos.

ZAHNOW (1987), estudando método analítico com o uso de cromatografia líquida para detectar diuron em soja, cenoura e batata, detectou também, linuron, neburon e três metabólitos do diuron, (3,4 diclorofenil-N-metilureia (DCPMU), (3,4-diclorofenil)-uréia (DCPU) e 3,4 dicloroanilina (DCA). O tempo de retenção obtido para o diuron e os três metabólitos foram: 13,1; 12,4; 13,5; 18,4 minutos.

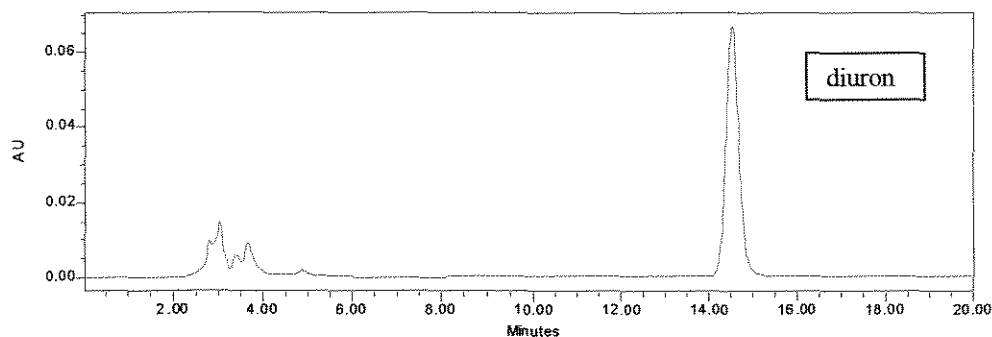


Figura 4.26: Cromatograma do controle contendo diuron.

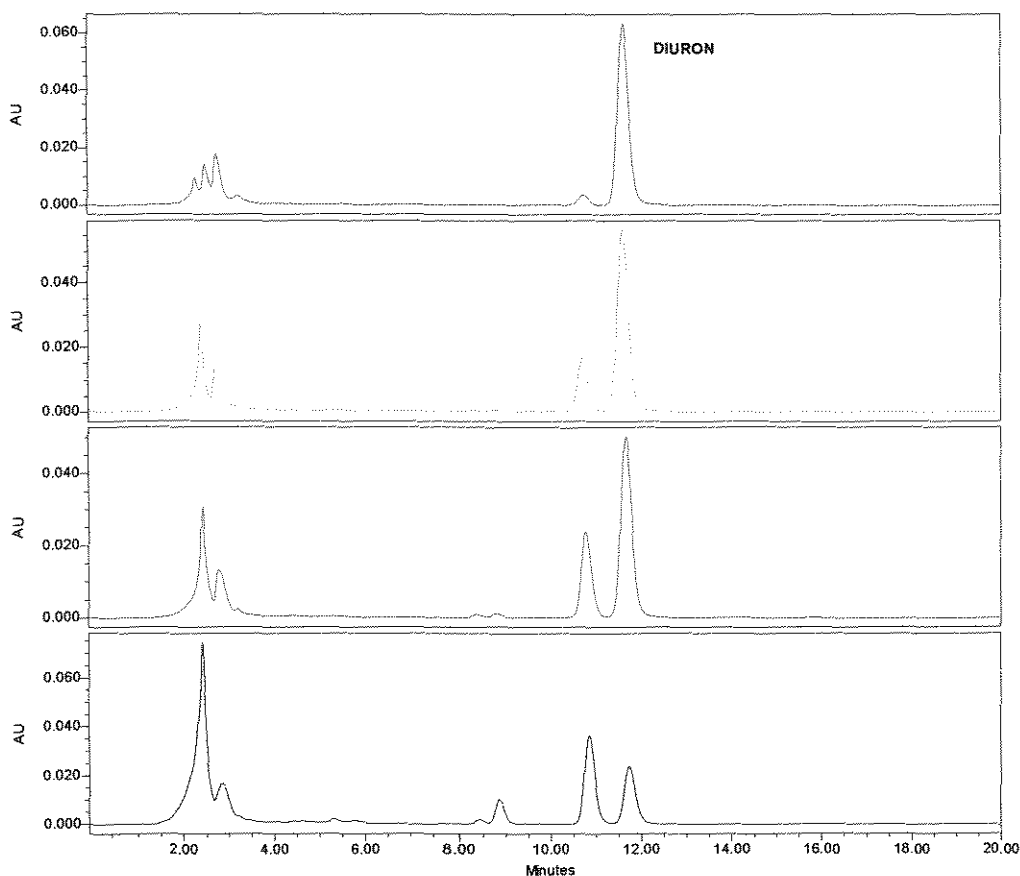


Figura 4.27: Cromatogramas do isolado de solo SRP17c crescido em diuron em (—) 3 dias, (---) 7 dias, (---) 10 dias, (---) 14 dias.

Na figura 4.28 estão representados os cromatogramas da linhagem *P. chrysosporium*, que apresentou a mais baixa taxa de degradação do diuron (3,88%). Comparando com a linhagem SRP17c, pode-se verificar que não ocorreu a diminuição do pico do diuron, bem como formação de outros picos.

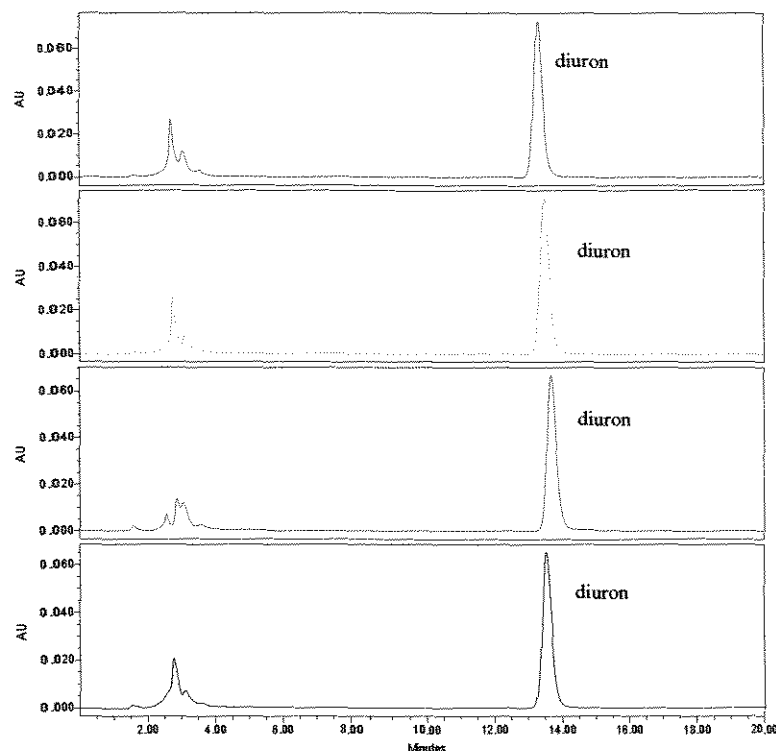


Figura 4.28: Cromatograma da linhagem *P.chrysosporium* crescida em diuron em (—) 3 dias, (---) 7 dias, (---) 10 dias e (---) 14 dias.

Verificou-se que todos os fungos produziram MnP, LiP e peroxidase; a enzima predominante, quando se utilizou o herbicida diuron, como fonte de carbono, foi MnP, produzida em maior quantidade por todos os fungos, atingindo os valores de $19,01 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$; $19,46 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e $63,94 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$; pelo isolado de solo DRP02n e as linhagens *Pleurotus* sp (CCB 507) e *Pleurotus* sp (CCB 068) respectivamente

Não se verificou produção de lacase pela maioria dos fungos nos dias estudados; destacou-se alta produção de lacase apenas pela linhagem *Pleurotus* sp (CCB 068), no 10.^o dia de experimento ($4,79 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Neste trabalho sobre degradação do diuron, todos os fungos estudados conseguiram degradar certa porcentagem desse herbicida.

ESPOSITO et al. (1998), estudando enzimas intracelulares e extracelulares (lacase, peroxidase, Lignina-peroxidase e manganês-peroxidase), associadas à degradação do diuron pela linhagem de actinomiceto CCT 4916, sugerem que a MnP pode ser a única enzima responsável pela oxidação da estrutura aromática do diuron. A MnP que depende da H_2O_2 para sua atividade, catalisa a oxidação de compostos aromáticos via oxidação de um elétron, seguida por uma série de reações não enzimáticas, produzindo vários tipos de produtos de degradação. A linhagem CCT 4916 que produziu MnP apresentou a mais eficiente degradação (37%), sugerindo que essa enzima tenha um papel na degradação deste herbicida. Os resultados sugerem que a linhagem CCT 4916 metabolizou o diuron utilizando uma rota metabólica secundária, não diretamente associada com a formação de compostos necessários para o crescimento vegetativo.

Em outros trabalhos, como o de FRATILA-APACHIETEI et al.(1999), verificou-se atividade de LiP e MnP para uma linhagem de *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767, com a enzima MnP exibindo maior atividade ($58\text{ U L}^{-1}\text{ min}^{-1}$ no 10.^o dia) comparada com a LiP ($10\text{ U L}^{-1}\text{ min}^{-1}$ 11.^o dia). Foi obtida degradação de 75% do diuron por *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767, sugerindo que existe uma coincidência temporal entre o aumento do crescimento idiofásico, a queda da taxa de nitrogênio, a produção de enzima extracelular (MnP) e a degradação do diuron. Essa descoberta também sugere que a degradação do diuron envolve o sistema ligninolítico dos fungos, sendo MnP a enzima dominante. As investigações preliminares deste trabalho demonstraram maior atividade ligninolítica na presença de diuron do que na ausência desse herbicida, indicando possível especificidade de substrato dessas enzimas para o diuron.

Tais resultados estão em concordância com este trabalho, visto que a enzima MnP apresentou os maiores valores de atividade, quando comparadas com as outras enzimas estudadas (LiP, peroxidase e lacase).

4.6 PYRITHIOBAC-SODIUM COMO FONTE DE CARBONO

Os 13 fungos foram incubados em Meio Líquido Base (Tabela 3.4), e o pyrithiobac-sodium foi adicionado na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ após três dias de crescimento do inóculo.

O pH do meio foi determinado após 3, 7, 10 e 14 dias da adição do pyrithiobac-sodium. Os meios apresentaram pH variando em uma faixa entre 3,03 a 6,19, conforme tabela 4.10. Os fungos *Pleurotus* sp BCCB 507, *Ag.campestris*, *Pleurotus* sp CCB068, DP24o e DRP02n mostraram comportamento diferente dos outros fungos, apresentando acidificação do meio de cultivo. A acidificação do meio sugere ocorrência de degradação do composto.

Tabela 4.10: Valores de pH dos fungos que cresceram em pyrithiobac-sodium como fonte de carbono.

Fungos	pH			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
Controle	5,12	5,26	5,03	4,95
BCCB507	5,56	4,10	4,42	5,52
<i>Ag.campestris</i>	3,50	3,03	3,34	3,72
<i>P.crysosporium</i>	6,00	5,97	5,93	5,88
<i>P. sp</i> (CCB068)	3,45	3,92	4,41	4,90
<i>Pleurotus</i> (016)	5,78	5,72	5,28	5,44
DP24e	4,93	5,52	5,64	5,85
DP24o	5,00	3,23	3,29	3,44
DRP02n	4,04	5,53	5,49	5,35
DRP02e	5,84	6,05	6,05	6,14
SP16a	5,74	5,80	5,89	5,76
SRP17g	5,93	6,02	6,01	5,97
SRP17c	5,75	5,82	6,12	5,99
SRP20e	5,80	5,94	6,18	6,19

4.7 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

As atividades das enzimas ligninolíticas, produzidas pelos fungos após 3, 7, 10, 14 dias da adição do pyrithiobac-sodium, estão descritas nas tabelas 4.11 e 4.12.

Pode-se constatar que, em meio líquido contendo pyrithibac-sodium como fonte de carbono, houve maior produção de manganês-peroxidase seguida pela produção de peroxidase, lignina-peroxidase e lacase .

Observa-se na tabela 4.11 que todas as linhagens de basidiomicetos e fungos isolados de solo apresentaram atividade de MnP. As linhagens *P.chrysosporium* e *Pleurotus* sp CCB 068 revelaram maior produção de MnP no 14.^o dia (34,12 U L⁻¹ min⁻¹ e 96,68 U L⁻¹ min⁻¹) respectivamente.

Tabela 4.11: Atividade de MnP e LiP dos fungos crescidos em pyrithiobac-sodium como fonte de carbono

Fungos	MnP (U/L.min)				LiP (U/L.min)			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
<i>P. sp</i> (BCCB507)	ND	3,05	ND	6,10	0,08	ND	0,10	0,21
<i>Ag.campestris</i>	0,90	ND	0,58	ND	0,17	0,07	ND	ND
<i>P. chrysosporium</i>	ND	21,25	14,39	34,12	0,33	ND	0,16	ND
CCB068	0,27	0,72	32,96	96,68	0,04	0,41	0,27	ND
<i>Pleurotus</i> 016	ND	1,52	ND	4,53	ND	0,05	0,13	ND
DP24e	ND	ND	ND	5,43	0,02	0,32	ND	ND
DP24o	ND	7,58	ND	4,35	0,01	0,22	ND	0,68
DRP02n	ND	19,64	2,65	2,29	ND	0,04	0,09	ND
DRP02e	4,53	9,06	ND	2,42	ND	0,07	ND	0,06
SP16a	0,54	10,90	ND	2,06	ND	0,50	1,94	ND
SRP17g	ND	11,03	1,17	ND	0,04	ND	ND	0,23
SRP17c	ND	8,79	ND	ND	0,04	ND	ND	ND
SRP20e	ND	7,49	2,78	ND	ND	ND	ND	ND

ND: não detectado

Tabela 4. 12: Atividade de lacase e peroxidase dos fungos crescidos em pyrrithiobac-sodium como fonte de carbono

Fungos	Lacase (U/L.min)				Peroxidase (U/L.min)			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
<i>P. sp</i> (BCCB507)	ND	ND	ND	1,09	0,34	0,10	0,01	0,06
<i>Ag.campestris</i>	ND	ND	ND	ND	0,07	0,36	ND	ND
<i>P.chrysosporium</i>	ND	0,20	ND	0,04	0,46	0,06	ND	ND
<i>P. sp</i> (CCB068)	ND	2,30	1,38	1,45	ND	4,39	2,68	2,49
<i>Pleurotus</i> 016	ND	0,01	ND	ND	0,41	0,44	ND	ND
DP24e	0,18	0,33	ND	0,15	0,41	0,24	ND	ND
DP24o	0,05	0,19	0,03	0,10	0,54	0,24	ND	ND
DRF02n	0,01	0,19	0,27	0,19	0,56	0,35	ND	ND
DRF02e	0,10	0,24	0,14	ND	0,59	0,09	ND	ND
SP16a	ND	ND	ND	0,23	0,24	0,15	ND	ND
SRP17g	0,06	0,07	ND	0,32	0,52	0,21	ND	ND
SRP17c	ND	0,08	0,01	0,14	0,42	0,13	ND	ND
SRP20e	ND	0,11	0,02	ND	0,29	0,21	ND	ND

ND: não detectado.

Na tabela 4.11, estão descritas as atividades de LiP, cujos resultados revelam que todas as linhagens produziram LiP, exceto, SRP20e que não apresentou essa atividade. Entretanto, as maiores atividades de LiP foram verificadas nos fungos isolados de solo SP16a ($1,94 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), DP24o ($0,68 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e nos basidiomicetos *P.chrysosporium* ($0,33 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e *Pleurotus sp* CCB 068 ($0,41 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

A enzima lacase foi produzida por todos os fungos (Tabela 4.12) excetuando a linhagem *Ag.campestris* que não a produziu em nenhum dia. A linhagem *Pleurotus sp* CCB 068 apresentou a maior atividade de lacase ($2,38 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) no 10.º dia de cultivo.

A produção de peroxidase descrita na tabela 4.12 indica atividade para todos os fungos, no 3.º e 7.º dias de cultivo. Destacou-se a linhagem *Pleurotus sp* CCB 068 ($4,39 \text{ U L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) que apresentou elevados índices dessa enzima, a partir do 7.º dia de cultivo, quando comparada com os demais fungos estudados.

❖ Degradação do pyriithiobac-sodium

As amostras obtidas de cada linhagem de basidiomicetos e dos fungos isolados de solo obtiveram as porcentagens de degradação avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como descritas na tabela 4.13, quando se utilizou pyriithiobac-sodium como fonte de carbono.

Tabela 4.13: Porcentagem de Degradação de pyriithiobac-sodium produzida pelas linhagens após crescimento na concentração de 10 µg mL⁻¹

Fungos	Degradação			
	3 dias	7 dias	10 dias	14 dias
	%			
BCCB507	1,61	16,10	0,00	0,00
<i>A.campestris</i>	7,15	21,25	19,07	37,86
<i>P.chrysosporium</i>	0,00	4,01	0,00	0,00
CCB068	25,36	60,16	61,35	59,63
<i>Pleurotus 016</i>	0,00	0,28	0,00	0,00

Os dados de CLAE atestam que somente a linhagem *Pleurotus* sp CCB 068 foi capaz de degradar o pyriithiobac-sodium, acima de 50%. Juntamente com a linhagem *Pleurotus* sp CCB 068 (61,35%), as linhagens *Pleurotus* sp BCCB 507 (16,10%), *Ag.campestris* (37,86%) e *P.chrysosporium* (4,01%) foram capazes de degradar certa porcentagem de pyriithiobac-sodium. Os fungos isolados de solo não foram capazes de degradar o pyriithiobac-sodium na concentração de 10 µg mL⁻¹. A presença de pyriithiobac-sodium foi observada em todas as amostras através do pico entre 11,16 e 11,39 minutos.

A figura 4.29 representa os gráficos referentes as atividades enzimáticas, tempo de cultivo e porcentagem de degradação das linhagens *Pleurotus* sp (CCB068) e *Ag. campestris* as quais foram selecionadas como

mais promissoras, por apresentarem melhores resultados de degradação e enzimáticos nos dias analisados.

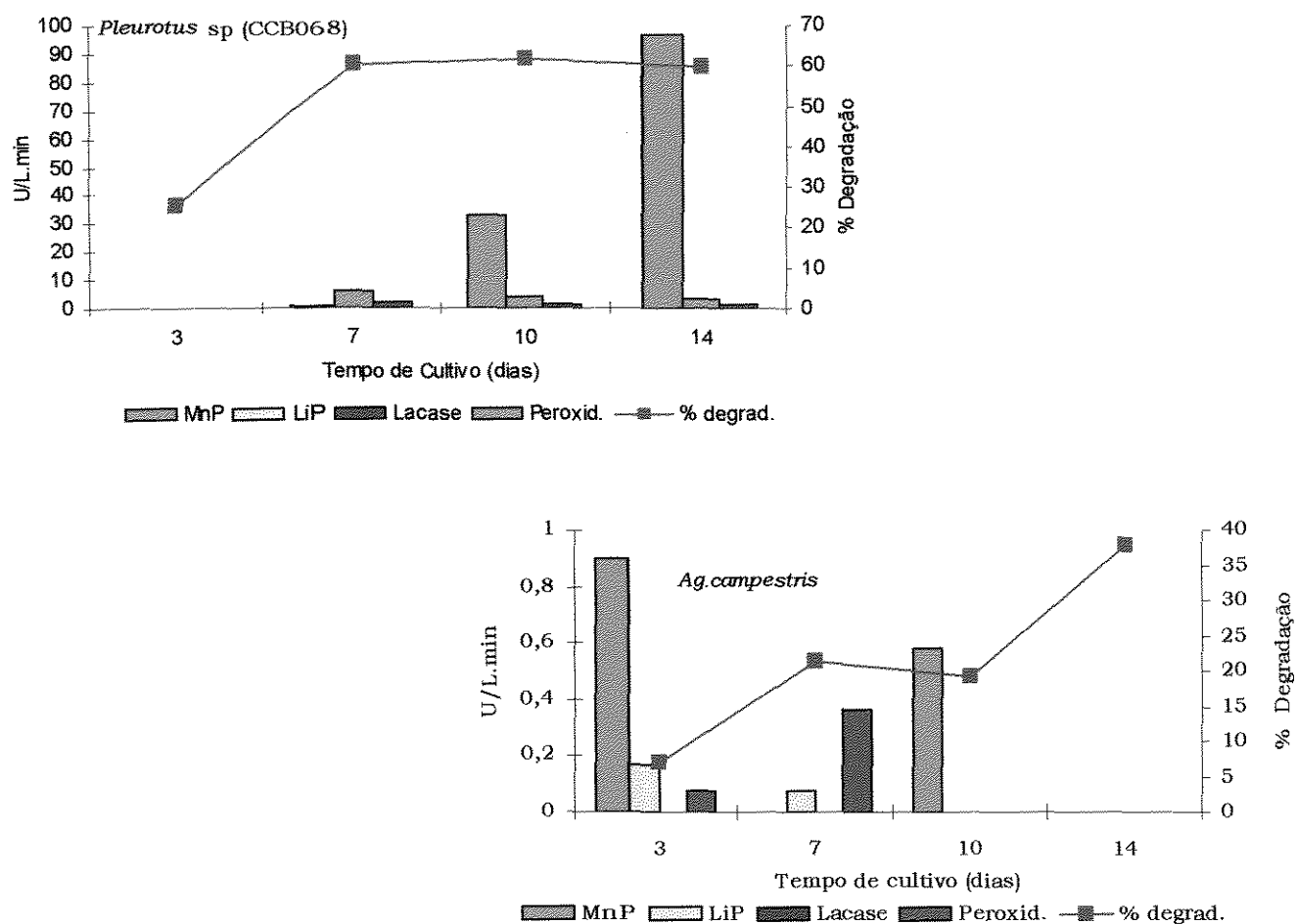


Figura 4. 29: Atividades enzimáticas produzidas pelas linhagens *Pleurotus* sp (CCB068), *Ag.campestris* e porcentagem de degradação quando se utilizou pytitthiobac-sodium como fonte de carbono na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As Figuras 4.30, 4.31 e 4.32 representam os cromatogramas do controle das linhagens *Pleurotus* sp CCB 068 e *P. chrysosporium*. Na linhagem *Pleurotus* sp CCB 068, que registrou a mais alta taxa de

degradação para o pyrithiobac-sodium, verifica-se o aparecimento de um pico em 3,5 minutos, à medida que o pico de pyrithiobac-sodium diminui. Para a linhagem *P. chrysosporium*, que apresentou baixa percentagem de degradação (4,01%), o aparecimento desse pico não foi detectado.

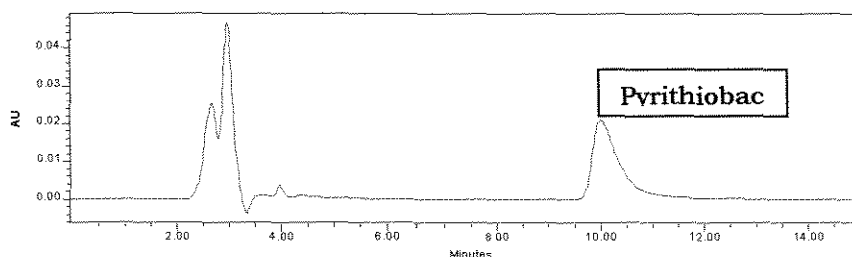


Figura 4.30: Cromatograma do controle contendo pyrithiobac-sodium.

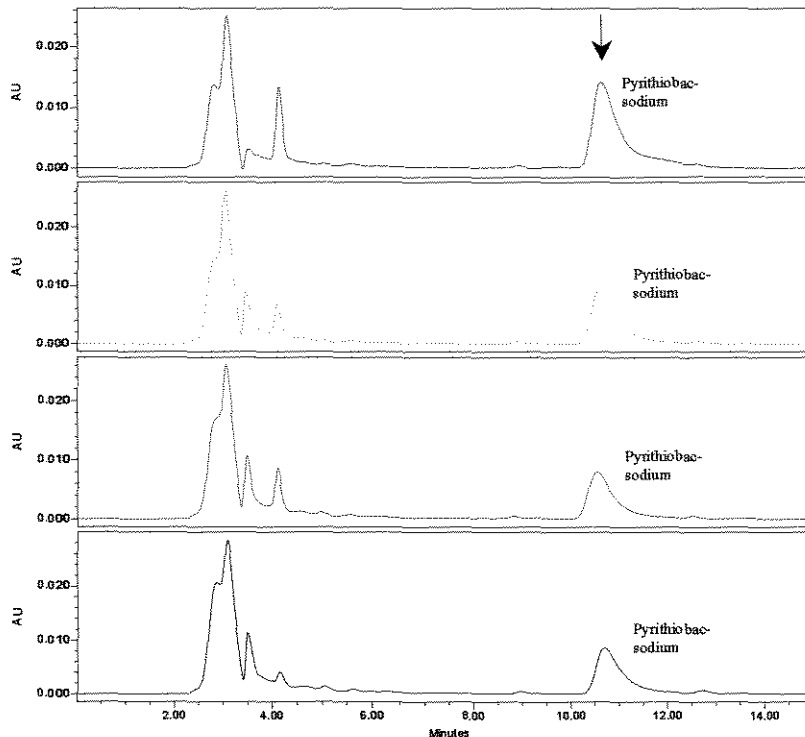


Figura 4.31: Cromatograma da linhagem *Pleurotus* sp (CCB 068) crescida em pyrithiobac-sodium em (—) 3 dias, (- -) 7 dias, (—) 10 dias e (—) 14 dias.

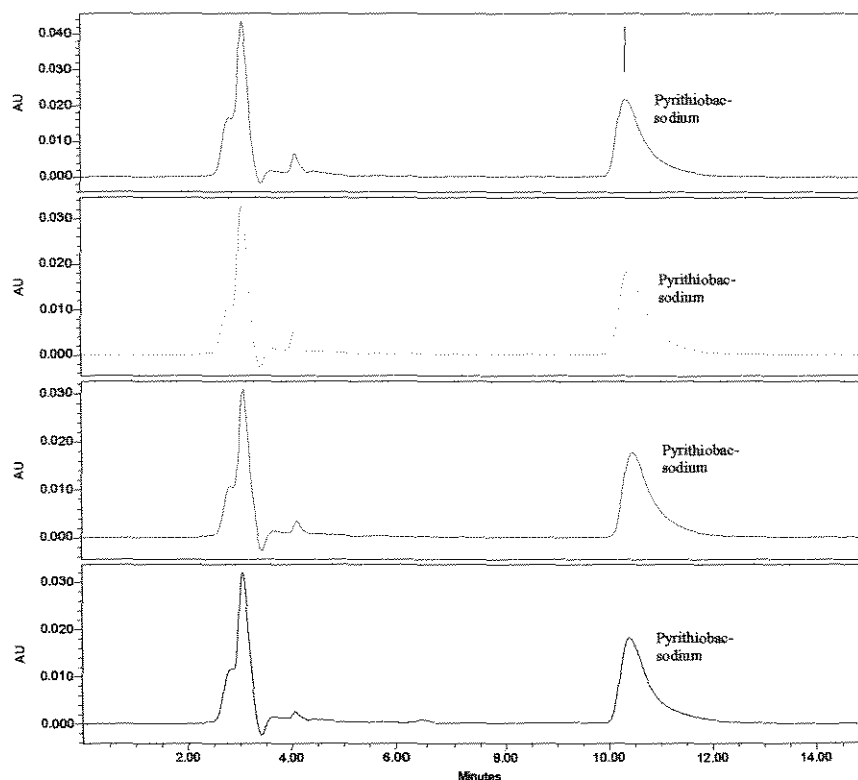


Figura 4.32: Cromatograma da linhagem *P.chrysosporium* crescida em pyriithiobac-sodium em (—) 3 dias, (---) 7 dias, (---) 10 dias e (---) 14 dias.

4.8 DEGRADAÇÃO DO DIURON E PYRITHIOBAC-SODIUM

Os resultados das análises enzimáticas e de degradação possibilitaram a escolha das linhagens *Pleurotus* sp CCB 068, *Pleurotus* sp CCB 507 e SRP17c quando se utilizou diuron como fonte de carbono; e das linhagens *Pleurotus* sp CCB 068 e *Agaricus campestris* como as que obtiveram a maior porcentagem de degradação e atividades enzimáticas, quando pyriithiobac-sodium foi usado como fonte de carbono. Com essas linhagens, foram realizados testes de porcentagem de degradação e de formação da biomassa fúngica.

4.8.1 Diuron

❖ Degradação do diuron

A porcentagem de degradação das linhagens em estudo estão representadas na figura 4.33. As linhagens degradaram o diuron nas duas concentrações utilizadas ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $35 \mu\text{g mL}^{-1}$). As maiores taxas de degradação foram observadas no sobrenadante do fungo isolado de solo SRP17c (84,74%) no 9.^o dia de cultivo, com concentração inicial de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$; SRP17c (73,46%) no 3.^o dia de cultivo, com concentração inicial de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a linhagem *Pleurotus* sp CCB068 (55,11%) no 25.^o dia de cultivo, com concentração inicial de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$.

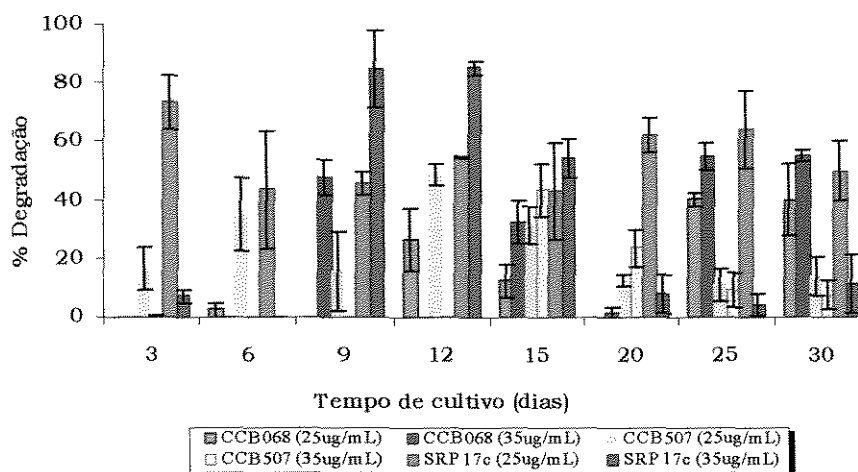


Figura 4.33: Porcentagem de degradação de diuron produzida pelas linhagens após crescimento em diuron nas concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $35 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Com base nos resultados, as elevadas porcentagens de degradação obtidas pela linhagem SRP17c, maior do que 70% nas duas concentrações utilizadas, podem estar sofrendo a influência, não somente das enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, lacase e peroxidase), mas também de outras enzimas, que podem estar atuando na degradação do diuron.

VEROUMSIA et al. (1996) realizaram uma seleção de 90 linhagens isoladas de solo pertencentes a vários grupos taxonômicos, cultivadas em meio com três herbicidas pertencentes ao grupo das fenilureias substituídas (chlortoluron, diuron e isoproturon) e verificaram que a única linhagem que conseguiu porcentagem de degradação acima de 70% para as três fenilureias substituídas foi *Rhizoctonia solani*, apesar dessa linhagem ser levemente afetada pela toxicidade do diuron. As enzimas ou sistemas enzimáticos responsáveis pela degradação das três uréias pela *Rhizoctonia solani* foi, provavelmente, constitutiva e intracelular, já que não foi necessária adaptação (fase lag) do microrganismo para a degradação desses compostos.

BENDING et al. (2002), estudando a degradação de pesticidas monoaromáticos por fungos basidiomicetos, verificaram que a degradação do lindane pelo *P. chrysosporium* ocorreu através da detoxificação pela monooxigenase citocromo P-450, independentemente da produção de enzimas ligninolíticas.

4.8.2 Pyriithiobac-sodium

As linhagens foram incubadas nesse herbicida durante 30 dias, sendo o pyriithiobac-sodium adicionado no 3.^o dia de cultivo nas concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em triplicata.

❖ Degradação do pyriithiobac-sodium

Nas determinações da porcentagem de degradação, representada na figura 4.34, as duas linhagens degradaram nas duas concentrações utilizadas de pyriithiobac-sodium. As maiores taxas de degradação foram produzidas pelo *Pleurotus* sp CCB 068 (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no 20.^o dia de cultivo (94,61%) e *Pleurotus* sp CCB 068 (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no 25.^o dia de cultivo (86,42%).

A linhagem *Ag. campestris* apresentou sua mais alta taxa de degradação no 30.^o dia de cultivo (53,36%) quando se utilizou a concentração inicial de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

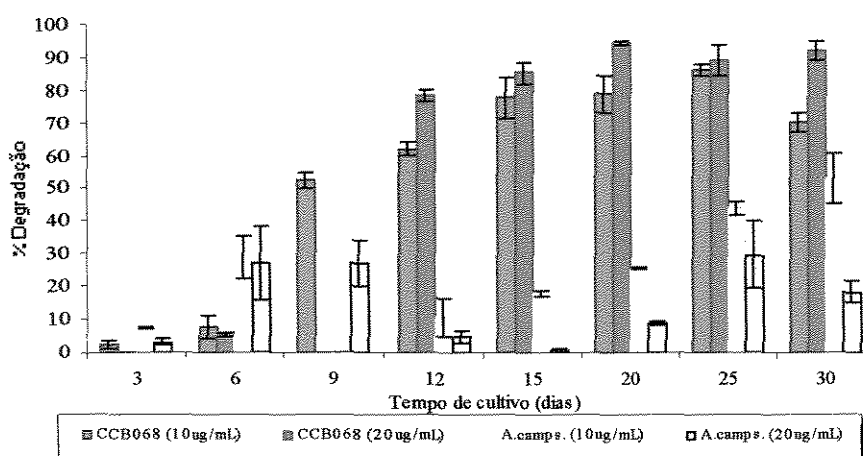


Figura 4.34: Porcentagem de degradação de pyriproxyfen-sódio produzida pelas linhagens após crescimento em pyriproxyfen-sódio nas concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.9 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA

A produção da biomassa fúngica foi estimada monitorando o aumento da proteína micelial segundo MESSNER e KUBICEK (1991).

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

4.9.1 Adição de diuron e pyriproxyfen-sodium

As linhagens foram incubadas utilizando diuron como fonte de carbono, nas concentrações iniciais de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e em

pyrithiobac-sodium, de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, durante 30 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

Na figura 4.35 observa-se a formação da biomassa fúngica produzida pelas linhagens *Pleurotus* sp CCB 068, *Pleurotus* sp BCC B507 e o isolado de solo SRP17c, quando se utilizou diuron como fonte de carbono.

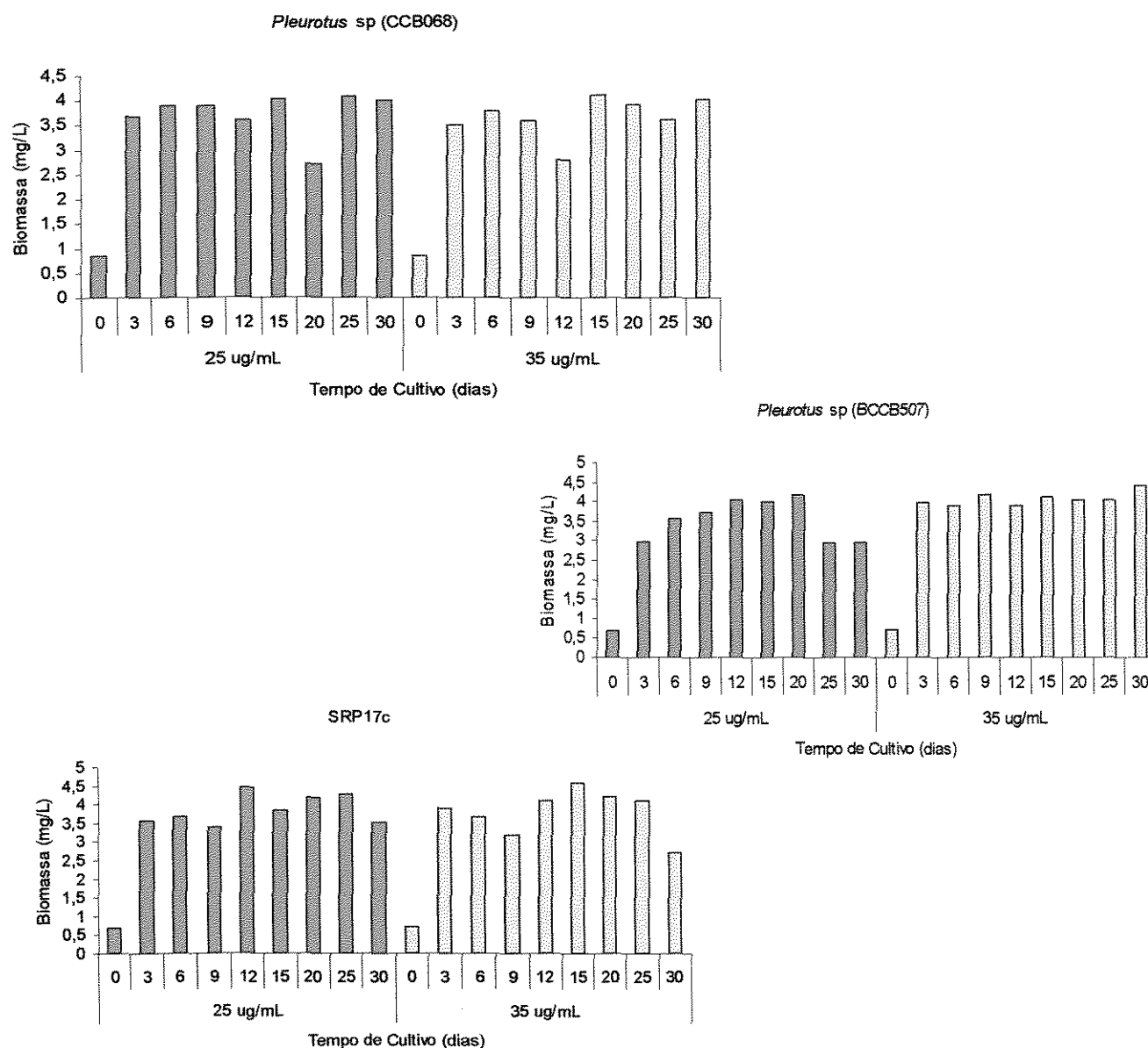


Figura 4.35: Formação da biomassa fúngica, após crescimento das linhagens em diuron nas concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $35 \mu\text{g mL}^{-1}$

De acordo com a figura 4.35 observou-se que todas as linhagens estudadas apresentaram produção de biomassa. A linhagem SRP17c ($35\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou maior formação de biomassa com uma produção máxima de 4.60 mg.

A formação de biomassa fúngica pelas linhagens *Pleurotus* sp CCB 068 e *Agaricus campestris* quando foi utilizado pyrithiobac-sodium como fonte de carbono está representada na figura 4.36.

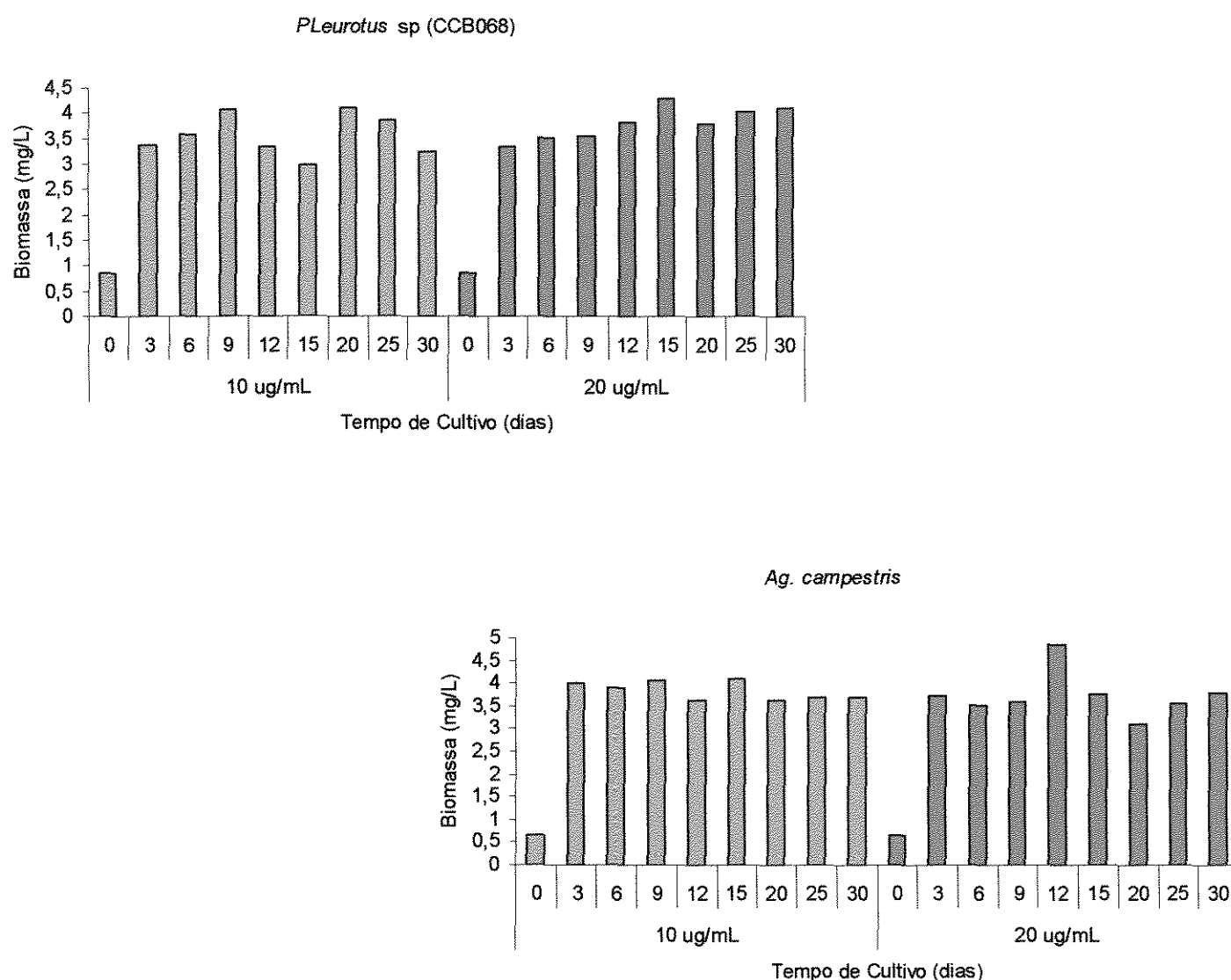


Figura 4.36: Formação de biomassa, após crescimento das linhagens em pyrithiobac-sodium nas concentrações de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ e $20\mu\text{g mL}^{-1}$.

De acordo com a figura 4.36, observou-se que as duas linhagens produziram biomassa fúngica; o pico máximo de produção foi obtido com a linhagem *Agaricus campestris* ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) 4.85 mg.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM SRP17c

A linhagem fúngica SRP17c desenvolveu-se rapidamente, atingindo o máximo crescimento micelial em quatro dias, apresentando textura acotonada. Inicialmente, a cor da colônia mostrou-se branca, mudando para amarelo-pardo com o tempo. Ao microscópio ótico, após coloração com lactofenol azul de algodão, foram observados esporângios, rizóides e estolão. Esse tipo de estrutura, juntamente com as características apresentadas, sugere que o fungo possa pertencer ao gênero *Rhizopus* (ALEXPOULOS et al., 1996).

Essa linhagem apresentou elevadas taxas de degradação quando se utilizou diuron como fonte de carbono.

5. CONCLUSÕES

No experimento em casa de vegetação, observou-se que para a contagem de bactérias e actinomicetos, as populações variaram de 10^6 a 10^7 ufc g^{-1} de solo. A população de fungos variou na faixa de 10^3 a 10^4 ufc g^{-1} de solo, exceto o solo arenoso com as doses de pyriithiobac-sodium, cuja população oscilou de 10^4 a 10^5 ufc g^{-1} de solo.

O isolamento de culturas puras de fungos potencialmente degradadores de herbicidas foi bem sucedido. 55 fungos foram isolados no solo contendo diuron e 51 no solo contendo pyriithiobac-sodium.

Dentre os microrganismos isolados no experimento de solo, oito linhagens foram selecionadas: DP24e, DP24o, DRP02n, DRP02e, SP16a, SRP17g, SRP17c e SRP20e por terem apresentado maior resistência e/ou tolerância aos respectivos herbicidas.

Entre os 24 fungos da Classe Basidiomicetos, avaliados quanto à resistência e/ou tolerância aos herbicidas diuron e pyriithiobac-sodium, destacaram-se: *P. chrysosporium*, *Ag. campestris*, *Pleurotus* sp 016, *Pleurotus* sp (CCB 068) e *Pleurotus* sp (BCCB 507).

As atividades das enzimas LiP, MnP e peroxidase foram detectadas nos sobrenadantes das linhagens exceto SRP17g que não produziu LiP. A lacase foi produzida somente pelas linhagens *P. chrysosporium*, *Pleurotus* sp (CCB 068), DP24e, DRP02n, DRP02e e SRP17g quando se utilizou diuron como substrato.

Em meio contendo pyriithiobac-sodium foi detectada LiP, MnP, lacase e peroxidase para todas as linhagens exceto *Ag. campestris* e SRP20e que não produziram lacase e LiP respectivamente.

Quando o diuron foi utilizado como fonte de carbono, os fungos que apresentaram as mais elevadas porcentagens de degradação foram *Pleurotus* sp (BCCB 507), *Pleurotus* sp (CCB 068), SRP17g e SRP17c. A

enzima MnP foi predominante para estes fungos indicando importante papel na degradação desse composto, não descartando a atuação das outras enzimas.

Na presença de pyriithiobac-sodium, como fonte de carbono, os fungos que apresentaram maior porcentagem de degradação foram: *Pleurotus* sp (BCCB 507), *Ag. campestris*, *P. chrysosporium* e *Pleurotus* sp (CCB 068).

A concentrações mais elevadas de diuron e pyriithiobac sódio, as linhagens *Pleurotus* sp (CCB 068), *Pleurotus* sp (BCCB 507) e SRP17c; *Pleurotus* sp (CCB 068) e *Ag.campestris* obtiveram porcentagem de degradação acima de 50%.

Após o estudo da massa fúngica elevando as concentrações dos herbicidas verificou-se que não ocorreu inibição de crescimento das linhagens em nenhuma das duas concentrações utilizadas.

Conclui-se que as linhagens selecionadas, *Pleurotus* sp (CCB 068), *Pleurotus* sp (BCCB 507), SRP17c e *Ag. campestris* são capazes de crescer e degradar os herbicidas em estudo, tanto em meio sólido quanto em líquido, com porcentagem de degradação e produção de biomassa fúngica variando de acordo com a linhagem, tempo de incubação e fonte de carbono utilizada.

A análise da estrutura macroscópica e microscópica do fungo isolado de solo SRP17c sugere que pertença ao gênero *Rhizopus*.

Os resultados aqui apresentados atestam que as linhagens selecionadas neste trabalho possuem grande potencial para degradar herbicidas e podem ser testadas em futuras aplicações nos processos de biorremediação.

6. SUGESTÕES

- ✓ Estudar a rota metabólica de degradação dos herbicidas utilizados nesse trabalho.
- ✓ Utilizar consórcios microbiano com as linhagens que apresentaram as mais altas porcentagens de degradação.
- ✓ Estudar as enzimas intracelulares com o sistema citocromo P-450.
- ✓ Estudar as linhagens mais promissoras na degradação dos herbicidas utilizados no solo.
- ✓ Estudar a sorção do pyriithiobac-sodium nos diferentes solos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISLABIE, J.; LOYD-JONES, G. A review of bacterial degradation of pesticides. **The Australian Journal Soil Research**, v. 33, p. 925-942, 1995.

ALEXPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. John Wiley & Sons, 1996. 869p.

ANDER, P.; HATAKKA, A.; ERIKSSON, K.E. Vanilic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*, v.125, p.189-202, 1980.

ARAÚJO, A.J.; do ROSÁRIO, M.L.S.; ROLDAN, R. IV Agrotóxicos. In: Meio Ambiente Saúde e Trabalho. Rio de Janeiro: CUT -RJ, 2000 [online] Disponível em: <<http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/11agrotoxicos.htm>>

ASADA, Y.; MIYABE, M.; KIKKAVA, M.; KUWAHARA, M. Oxidation of NADH by a peroxidase of a lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete crysosporium*, and its involvement in the degradation of a lignin model compound. *Agricultural Biology and Chemistry*, v.50, p.525-529, 1986.

ATTAWAY, H.H.; PAYNTER, M.J.B.; CAMPER, N.D. Degradation of Selected Phenylurea Herbicides by Anaerobic Pond Sediment. *Journal of Environmental Science and Health*, v.B17, n.6, p. 683-699, 1982.

BARTHA, R. Isolation of microorganism that metabolize xenobiotic compounds. In: LABEDA, D.P. (Ed.). *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. New York: McGraw-Hill, cap.11, 1990.

BAVUTTI, H.R.F. *Isolamento, Seleção e Estudo de Microrganismos Ligninolíticos Degradadores de Chorume*. 2002, 152f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BENDING, G.D.; FRILOUX, M.; WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, v.212, p.59-63, 2002.

BERTRAND, G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C.R. Hebdomadaire des Seances academiques Sciences*, v.123, p.463-465, 1896.

BOLLAG, J.-M.; SHUTTLEWORTH, K.L.; ANDERSON, D.H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied Environmental Microbiology*, v.54, p.3086-3091, 1988.

BONATO, P.S. Cromatografia Gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 7ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.141-181.

BONNEN, M.A.; ANTÓN, L.H.; ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology*, v.60, p.960-965, 1994.

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

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

BURGOS, N.R.; KUK, Y.-IN; TALBERT, R.E. *Amaranthus palmeri* resistance and differential tolerance of *Amaranthus hybridus* to ALS-inhibitor herbicides. *Pest Management Science*, v.57, p.449-457, 2001.

BUSWELL, J.A.; ODIER, E. Lignin biodegradation. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v.6, p.1-60, 1987.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. History overview and application of mediated ligninolytic systems especially laccase-mediator-system (lignozym-process). *Journal Biotechnology*, v.53, p. 63-67, 1997.

CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S.D. Enzymology of *phanerochaete chrysosporium* with Respect to The degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.54, p.751-758, 2000.

CHEN, C.L.; POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; GRATZL, J.S.; KIRKMAN, A.G.; NAGAI, D.; MIYAKOSHI, T. Laccase-catalyzed oxidation of 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-propene using ABST as mediator. *Journal of Molecular catalysis B. Enzymatic*, v.8, p.213-219, 2000.

CHEN, C-I.; CHANG, H-M. Chemistry of lignin biodegradation. In: T.Higuchi. *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Orlando: Academic Press, 1985. p.535-556.

CHEVALIER, T.; de REGAL, D.; MBEGUIE, D.; GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; FILS-LYCAON, B.R. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, v.119, p.1261-1266, 1999.

CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia orizae*. *Applied Environmental Microbiology*, v.61, p.4374-4377, 1995.

CLEMENTE, A.R. *Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos ligninolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2002. 159f. Tese (Doutorado).

CLEMENTE, A.R.; ANAZAWA, T.A.; DURRANT, L.R. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Soil Fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.255-261, 2001.

CRIPPS, R.E.; ROBERTS, T.R. Microbial degradation of herbicides. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L. *Pesticide Microbiology: Microbial aspects of pesticide behavior in the environment*. London: Academic Press, 1978, 844p.

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

DALTON, R.L.; EVANS, A.W.; RHODES R.C. Desappearance of diuron from cotton field soils. *Weeds*, v.14, p.31-33, 1966.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p.81-88, 2001.

DuPont Agricultural Products. Staple Herbicide. *DuPont Agricultural Producte*, Wilmington, 1993. (Technical information)

ERIKSSON, K.E. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Science and Technology*, v.24, p.79-101, 1990.

ERIKSSON, K.E.; NISHIDA, A. Methanol Oxidase of *Phanrochaete chrysosporium*. *Methods of Enzymology*, v.161B, p.322-326, 1988.

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*. *Archives of Microbiology*, v.135, p.161-168, 1983.

ESPOSITO, E., PAULILLO, S.M.; MANFIO, G.P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomicetes. *Chemosphere*, Great Britain, v.37, n.3, p.541-548, 1998.

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

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M.; GONZÁLES-PRADAS, E.; FLORES-CÉSPEDES, F. Controlled release of diuron from an alginate-bentonite formulation: water release kinetics and soil mobility study. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, v.47, p.791-798, 1999.

FAY, E.F.; SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.de. Degradação abiótica de xenobióticos. In: MELO, I.S.de; AZEVEDO, J.L. de (Eds). *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa-CNPA, 1997. cap.5, p.125-140.

FIELD, J.A.; de JONG, E.; FELJOO-COSTA, G.; de BONT, J.A.M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Journal of Biotechnology*, v.11, p.44-48, 1993.

FIELD, J.A.; REED, R.L.; SAWYER, T.E.; MARTINEZ, M. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.45, p.3897-3902, 1997.

FRATILA-APACHITEL, L.E.; HIRST, J.A.; SIEBEL, M.A.; GIYZEN, M.J.; Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F. 1767. *Synthetic and Natural Media Biotechnology Letters*, v.21, p.147-154, 1999.

FRIGHETTO, R.T.S. Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. cap.17, 440p.

GAILLARDON, P. Influence of soil moisture on long-term sorption of diuron and isoproturon by soil. *Pesticide Science*, v.47, p.347-354, 1996.

GHOSHEH, H.Z.; PROSTKO, E.P.; TINGLE, C.H.; CHANDLER, J.M. Simulated pyriproxyfen drift effects on corn (*Zea mays*) and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Crop Protection*, v.21, p.529-532, 2002.

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

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.242, p.329-341, 1985.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Descolorization of several polymeric dyes by the lignin-degradation basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.45, p.1741-1747, 1983.

GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; MAYFIELD, M.B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M.H. An Extracellular H₂O₂ – Requiring enzyme preparation involved in the lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, v.114, p.1077-1083, 1983.

GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology Reviews*, v.57, n.3, p.606-622, 1993.

GOLD, M.H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidase involved, in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symposium*, v.389, p.127-140, 1989.

GOLOVLEVA, L.A.; ALIYEVA, R.M.; NAUMOVA, R.P.; GVOZDYAK, P.I. Microbial bioconversion off pollutants. *Review of Contamination and Toxicology*, v.124, p.41-78, 1992.

GREENE, R.V.; GOLD, J.M. Fatty Acyl-coenzyme A oxidase activity and H₂O₂ production in *Phanerochaete chrysosporium*. *Mycelia. Biochemistry and Biophysics Research Community*, v.118, p.437-443, 1984.

GUILLÉN, F.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, v.209, p.603-611, 1992.

HATAKA, A. Lignin-modifying from selected white-rot fungi: production and role in lignin biodegradation. *FEMS Microbiology Reviews*, v.13, p.125-135, 1994.

HERNANDEZ, M.M.A.; VIEIRA, R.M.; URDANIVIA, M.A. Decomposición del herbicida diurón por acción de los microorganismos de um suelo ferralítico amarillento lixiviado. *Ciências de la Agricultura*, p.97-104, 1984.

HIGSON, F.K. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v.122, p.111-153, 1991.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry and biodegradation. *Wood Science and Technology*, v.24, p.23-63, 1990.

JONG, E. de; FIELD, J.A.; BONT, J.A.M. de. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, v.13, p.153-188, 1994.

JOVILET, S.; AIRPIN, N.; WICHES H.J.; PELLON, G. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycology Research*, v.102, p.1459-1483, 1998.

KELLEY, R.L.; REDDY, C.A. Purification and Characterization of Glucose Oxidase from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, v.166, p.269-274, 1988.

KHADLANI, A.; SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R.; VROUMSIA, T. Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil. *Chemosphere*, v.38, n.13, p.3041-3050, 1999.

KAUFMANN, D.D.; EDWARDS, D.F. Pesticide/Microbe interaction effects on persistence in soil. In: MIYAMOTO, J. & KERNEY, P.C. *Pesticide Chemistry: Human and the Welfare and the Environmental*. Oxford: Pergamon Press, 1982. p.1777-1792.

KIM, J.E.; FERNÁNDEZ, E.; BOLLAG, J.M. Enzymatic coupling of the herbicide bentazon with humus and characterization of reaction products. *Environmental Science Technology*, v.31, p.2392-2398, 1997.

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

KIRK, T.K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potencial applications, 2ed. Boca Ration: CRC Press, v.2, 1981.

KÖLLER, G.; MÖDER, M.; CZIHAL, K. Peroxidative degradation of selected pcb: a mechanistic study. *Chemosphere*, v.41, p.1827-1834, 2001.

KUMAR, S.; MUKERJI, K.G. & LAL, R. Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Review in Microbiology*, v.22, n.1, p.1-26, 1996.

KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Sparation and caracterization of two extracellular H₂O₂ – dependet oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, v.169, n.2, p.247-250, 1984.

LABEDA, D.P.; SHEARER, M.C. Isolation of actinomicetes for biotechnological applications. In: LABEDA, D.P. (Ed.) *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. New York: McGraw-Hill, 1990. cap.1.

LABORDES, J. Sur Laccase des vins. *C.R. Hebd Seances academic Sciences*, v.123, p.1074-1075, 1896.

LACKNER, R.; SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, v.178, p.1092-1098, 1991.

LEONOWICZ, A.; MATUSZWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N-S; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Review: biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v.27, p.175-185, 1999.

LEONOWICZ, A.; SZKLARZ, G.; WOJTAS-WASILEWSKA, M. The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (Peritan Na). *Phytochemistry*, v.24, p.393-396, 1985.

MATHIAS, A.L.; LPRETTI, M.I.; RODRIGUES, A.E. Chemical and biological oxidation of *Pinus pinaster* lignin for production of vanillin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.64, p.225-234, 1995.

MATOCHA, C.J. & HOSSNER, L.R. Pyrethriobac sorption on reference sorbents and soils. *Journal agricultural Food Chemistry*, v.46, p.4435-4440, 1998.

MATOCHA, C.J.; HOSSNER, L.R. Mobility of the herbicide pyrethriobac through intact soil columns. *Journal agricultural Food Chemistry*, v.47, p.1755-1759, 1999.

McGUIRK, M.A.; DOOLEY, D.M. Copper-containing oxidases. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.3, p.138-144, 1999.

MESSNER, R.; KUBICEK, C.P. Carbon source control of cellobiohydrolase i and ii formation by *Trichoderma reesei*. *Applied Environmental Microbiology*, v.57, n.3, p.630-635, 1991.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de Herbicidas. In: Workshop sobre Biodegradação, 1996, Jaguariúna. Anais. Jaguariúna: EMBRAPA, 1996. p.120-128.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de Pesticidas em Solos Brasileiros. In: MELO, I.S. de; SILVA, C.M.M.S. de; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. *Biodegradação*. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2001. v.1, p.1-14.

MUNNHECKE, D.M. Detoxification of pesticides using soluble or immobilized enzymes. *Process Biochemistry*, p.14-31, 1978.

MUÑOZ de la PEÑA, A.; MAHEDERO, M.C.; BAUTISTA-SÁNCHEZ, A. Monitoring of phenylurea and propanil herbicides in river water by solid-phase-extraction high performance liquid chromatography with photoinduced-fluorimetric detection. *Talanta*, v.00, p.1-7, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 20 jun.2003.

NAIDU, M.V.; STRINGER, D.A.; DIETRICH, R.F. Metabolism of pyriithiobac sodium herbicide in cotton. *DuPont agricultural Products*, Experimental Statio, Wilmington, DE 19880-0402, [online] Disponível em: <http://www.chemsoc.org/chempest/html/5A-0010.html>. Acesso em 20 jun.2003.

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. *Applied Environmental and Microbiology*, v.59, p.260-265, 1993.

PAL, S.; CHOWDHURY, A.; MITRA, S.R. Fate and behaviour of diuron in the soils cooch behar and kalyani, West Bengal. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, v.55, n.12, p.747-750, 1985.

PARSEK, M.R.; McFALL, S.M.; CHAKRABARTY, A.M. Microbial degradation of toxic chemicals: evolutionary insights. In: MOO-YOUNG, M.; ANDERSON, W.A.; CHAKRABARTY, A.M. (Coords). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, Kluwer Academic Publishers, p.1-15, 1995.

PASZCZYNSKI, A.; HUYNH, V.V.B.; CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, v.29, p.37-41, 1985.

PELCZAR, M.J.Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Os Principais grupos de microrganismos eucarióticos: fungos, algas e protozoários. In: *Microbiologia Conceitos e Aplicações*. 2 ed. McGraw-Hill, 1996. v.1, cap.10, p.258-287.

PEREZ, J.; JEFFRIES, T.W. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 58, p.2402-2409, 1992.

PRADO, A.G.S.; AIROLDI, C. The toxic effect on soil microbial activity by the free or immobilized pesticide diuron. *Thermochimica Acta*, v.394, p.155-162, 2002.

PRATA, F. *Biodegradação e Adsorção dos Herbicidas Diuron e Ametrin em Solos Tratados com Vinhaça*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1998. 73f. Dissertação (Mestrado).

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; SCHEID, A.; BATAGLIA, O.C. *Análise Química do Solo para fins de Fertilidade*. Campinas: Fundação Cargil, 1987. p.79-82.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. *Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo*. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996. 285p. (Boletim Técnico, 100).

REDDY, C.A. An Overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, v.30, p.91-107, 1993.

REDDY, C.A.; D'SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Reviews*, v.13, p.137-152, 1994.

REID, I.D. Biodegradation of Lignin. *Canadian Journal of Botany*, Supplement 1, v.73, p.S1011-S1018, 1995.

RENGANATHAN, V.; GOLD, M.H. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, v.25, p.1626-1631, 1986.

REZENDE, M.I.; SCARMÍNIO, I.S.; MONTEIRO, R.T.R.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Efeito do herbicida Scepter (Imazaquin) na produção de lacases pelo *Pleurotus ostreatus* através de metodologia de superfície de resposta. In: MELO, I.S. de; SILVA, C.M.M.S.de; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. *Biodegradação*. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2001. v.1, p.341-347.

REZENDE, M.I. *Comparação da Produção de lacases pelo Pleurotus ostreatus e pelo Botryosphaeria sp na presença do herbicida scepter (imazaquin)*, Rio Claro-SP: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2002. 107f. Tese (Doutorado).

RIDDEL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology*, v.42, p.265-270, 1950.

RINGLING, D.; VAN ALFEN, N.K. Extra- and intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied Environmental Microbiology*, v.59, p.3634-3639, 1993.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. *Guia de Herbicidas*. 4 ed. Londrina: edição dos autores, 1998. p.229-240.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. *Guia de Herbicidas*. 4 ed. Londrina: edição dos autores, 1998, p.495-498.

ROQUE, M.R.A. *Isolamento, Caracterização e Ecologia de Acinetobacter baumannii Degradadora de Herbicida Diuron*. Rio Claro: Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2000. 119f. Tese (Doutorado).

SCRIBNER, E.A.; THURMAN, E.M.; ZIMMERMAN, L.R. Análisis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *The Science of the Total Environment*, v.248, p.157-167, 2000.

SETTE, L.D. *Isolamento e sistemática de actinomicetos degradadores de herbicidas*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 126f. Tese (Doutorado).

SILVA, C.M.M.S., FERRACINI, V.L. Avaliação da degradação microbiológica do diuron. In: SILVA, C.M.M.S., ROQUE, M.R.A., MELO, I.S. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa, 2000. p.21-31.

SILVA, N.M. Algodão. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Eds) *Recomendações de adubação e Calagem para o Estado de São Paulo*. 2.ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. p.109-111. (Boletim Técnico, 100)

SMITH, M.; THURSTON, C.F.; WOOD, D.A. Fungal Lacase: Role in delignification and possible industrial applications. In: A. MESSERRSCHMIDT (Ed). *Multi-copper oxidases*. Singapore: World Scientific, 1997. p.201-207.

SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Pesticide transformation products in the environment. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. *Pesticide Transformation Products: Fate and Significance in the Environment*. Washington, DC: American Chemical Society, 1991. 304p.

SRINIVASAN, C.; D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied environmental and Microbiology*, v.61, p.4274-4277, 1995.

STEPP, T.D.; CAMPER, N.D.; PAYNTER, M.J.B. Anaerobic Microbial Degradation of Selected 3,4-dihalogenated Aromatic Compounds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.23, p.256-260, 1985.

SUMPONO; PEROTTI, P.; BELAN, A.; FORESTIER, C.; LAVEDRINE, B.; BOHATIER, J. Effect of diuron on aquatic bacteria in laboratory-scale wastewater treatment ponds with special reference to *Aeromonas* species studied by colony hybridization. *Chemosphere*, v.50, p.445-455, 2003.

SUGUMARAN, M.; BOLTON, J.L. Laccase, and not tyrosinase, in the enzyme responsible for quinone methide production from 2,6-dimethoxy-4-allyl phenol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.353, n.2, pp.207-212, 1998.

SUMPTER, S.R.; PETERSON, B.A. Analytical method for the determination of kih-2031 (dpx-pe350) in water using column-switching liquid chromatography. Wilmington: *DuPont Agricultural Products*, Experimental Station, 1994. 58p. (DuPont report N°AMR 2746-93)

SZKLARZ, G.D., ANTIBUS, R.K., SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycology*, v.81, n.2, p.234-240, 1989.

SZKLARZ, G.D.; LEONOWICZ, A. Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in degradation of lignin derivatives. *Phytochemistry*, v.25, p.2537-2539, 1986.

TAGGER, S.; PÉRISSOL, C.; GIL, G.; VOGT, G.; LE PETIT, J. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* Isolated from an Evergreen Oak Litter (*Quercus ilix* L.). *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.372-379, 1998.

THURSTON, C.F. The Structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, v.140, p.9-26, 1994.

TIEN, M.; KIRK, T.K Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requieing oxygenase. *Proccedings of National Academy of Science*, v.81, p.2280-2284, 1884.

TIEN, M.; KIRK, T.K Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, v.221, p.661-663, 1983.

TILLMANS, G.M.; WALLNÖFER, P.R.; ENGELHARDT, G.; OLIE, K. and HUTZINGER, O. Oxidative dealkylation of five phenylurea herbicides by the fungus *Cunninghamella echinulata* (Thaxter). *Chemosphere*, v.1, p.59-64, 1978.

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

TOUR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v.41, p.1-17, 1995.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. [online] Disponível em: < http://www.biotecnologia.com.br/bio/10_i.html >. Acesso em: 15 julho 2003.

VALLI, K.; GOLD, M.H. Degradation of 2,4-dichlorophenol by The Lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, v.174, p.2131-2137, 1991.

VARELA, E.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T. Aryl-alcohol oxidase protein sequence: a comparasion with glucose and other FAD oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1481, p.202-208, 2000.

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*. *Archives of Microbiology*, v.156, p.297-301, 1991.

VOLC, J.; ERIKSSON, K.E. Pyranosa 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods of Enzymology*, v.161B, p.316-322, 1988.

VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J-L.; KHADRANI, A. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, and isoproturon) by soil fungi. A Comparative Study. *Chemosphere*, v.33, n.10, p.2045-2056, 1996.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic Mechanism and Role of Chelators. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, p.23688-23695, 1992.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. *In vitro* Depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, v.176, p.269-275, 1991.

WARIISHI, H.; GOLD, M.H. Lignin peroxidase compound iii. mechanism of formation and decomposition. *Journal of Biological Chemistry*, v.265, p. 2070-2077, 1990.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model cimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, v.28, p.6017-6023, 1989.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Diuron In: *Herbicide Handbook*. 8th. Lawrence: Weed Science Society of America, 2002. p.159-161.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Pyriithiobac-sodium In: *Herbicide Handbook*. 8th. Lawrence: Weed Science Society of America, 2002. p.384-385.

WIDHEM, P.; AÏT-AÏSSA, S.; TIXIER, C.; SANCELME, M.; VESCHAMBRE, H.; TRUFFAUT, N. Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere*, v.46, p. 527-534, 2002.

XU, H.; LESAGE, S.; DURHAM, L. The Use of humic acids to enhance removal of aromatic hydrocarbons from contaminated aquifers. Part I: Laboratory Studies. In: *Annual Groundwater and Soil Remediation*, 4. Calgary, Proceedings. Alberta. 1994. p.635-666.

YOSHIDA, H. Chemistry of Lacquer (Urushi) part 1. *Chemical Society*, v.43, p.472-486, 1883.

ZAHNOW, E.W. Analysis of the herbicide diuron in crops. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. v.135, p.403-406, 1987.